



RENAN MARRICHI MAUCH

**SOROLOGIA ANTI-IgG PARA DETECÇÃO DA INFECÇÃO
PULMONAR POR *Pseudomonas aeruginosa* EM PACIENTES COM
FIBROSE CÍSTICA ATENDIDOS NO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

CAMPINAS/SP

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

RENAN MARRICHI MAUCH

**SOROLOGIA ANTI-IgG PARA DETECÇÃO DA INFECÇÃO
PULMONAR POR *Pseudomonas aeruginosa* EM PACIENTES COM
FIBROSE CÍSTICA ATENDIDOS NO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Emilio Levy

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO **RENAN
MARRICHI MAUCH** E ORIENTADA PELO **PROF. DR.
CARLOS EMILIO LEVY**.

Assinatura do orientador

**Campinas/SP
2014**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

M441s Mauch, Renan Marrichi, 1988 -
 Sorologia anti-IgG para detecção da infecção
 pulmonar por Pseudomonas aeruginosa em pacientes
 com fibrose cística atendidos no Hospital de Clínicas da
 Universidade Estadual de Campinas / Renan Marrichi
 Mauch. -- Campinas, SP : [s.n.], 2014.

 Orientador : Carlos Emilio Levy.
 Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
 Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

 1. Fibrose cística. 2. Sorologia. 3. Pseudomonas
 aeruginosa. I. Levy, Carlos Emilio, 1949-. II.
 Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
 Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Anti-IgG serology for detection of Pseudomonas aeruginosa
pulmonary infection in cystic fibrosis patients attended at the Campinas State University
Hospital

Palavras-chave em inglês:

Cystic fibrosis

Serology

Pseudomonas aeruginosa

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Titulação: Mestre em Ciências

Banca examinadora:

Carlos Emilio Levy [Orientador]

Elsa Masae Mamizuka

Marina Buarque de Almeida

Data de defesa: 06-08-2014

Programa de Pós-Graduação: Saúde da Criança e do Adolescente

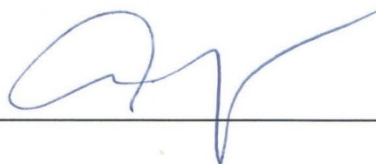
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

RENAN MARRICHI MAUCH

Orientador (a) PROF(A). DR(A). CARLOS EMÍLIO LEVY

MEMBROS:

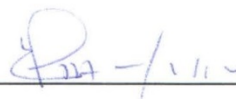
1. PROF(A). DR(A). CARLOS EMÍLIO LEVY



2. PROF(A). DR(A). MARINA BUARQUE DE ALMEIDA



3. PROF(A). DR(A). ELSA MASAE MAMIZUKA



Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 06 de agosto de 2014

RESUMO

A Fibrose Cística (FC) é uma doença genética decorrente da disfunção da proteína reguladora da condutância transmembrana (CFTR), essencial para o transporte de íons e água pela membrana celular, sendo a doença pulmonar a mais preponderante das manifestações, havendo colonização bacteriana seguida de infecções, principalmente por *Pseudomonas aeruginosa*, bactéria de maior relevância para pacientes com FC.

Neste estudo, buscamos padronizar e avaliar o valor diagnóstico e prognóstico de um teste de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) para pesquisa de anticorpos séricos IgG anti-*P. aeruginosa*, comparando os resultados com a cultura microbiológica de material respiratório (padrão-ouro atual). Os níveis de anticorpos foram avaliados primeiramente em um estudo transversal, com 117 pacientes com FC atendidos no HC-Unicamp, buscando determinar a acurácia do teste, e paralelamente em um estudo longitudinal, com 78 pacientes inicialmente sem infecção crônica por *P. aeruginosa*, buscando monitorar a variação dos níveis de anticorpos em diferentes períodos.

Observamos que a taxa de soropositividade e a mediana dos níveis de IgG anti-*Pseudomonas* foram significativamente maiores em pacientes cronicamente infectados pela bactéria, tendo o teste sensibilidade de 96,8%, especificidade de 98,1%, valor preditivo positivo de 96,8% e valor preditivo negativo de 98,1% para a detecção da infecção crônica. Houve aumento progressivo dos níveis de anticorpos dos pacientes ao longo do tempo, com maior significância em dois períodos de coleta, entre pacientes que apresentaram evolução no perfil de colonização/infecção por *P. aeruginosa*. Foi possível, pela pesquisa de anticorpos, a detecção da bactéria até 15 meses antes do primeiro isolamento positivo em cultura e pacientes com níveis de anticorpos elevados no início do estudo apresentaram maior risco de posterior evolução no perfil de colonização/infecção por *P. aeruginosa*.

Concluimos que a sorologia pode ser um recurso diagnóstico de grande utilidade para a detecção precoce da infecção pulmonar *P. aeruginosa* em pacientes com FC, complementando resultados da cultura microbiológica. Introduzindo-a na rotina de acompanhamento dos pacientes, será possível a terapia antimicrobiana precoce, o que poderá ajudar a melhorar a função pulmonar dos pacientes e sua qualidade de vida.

Palavras-chave: fibrose cística, sorologia, *Pseudomonas aeruginosa*

ABSTRACT

Cystic Fibrosis (CF) is a genetic disease, resulting from dysfunction of the CFTR protein, which is essential for the transportation of ions and water across the cell membrane, being the pulmonary disease the most prominent manifestation, where there is bacterial colonization followed by infections, mainly caused by *Pseudomonas aeruginosa*, the most relevant bacterium for CF patients.

The aim of this study was to standardize and to evaluate the diagnostic and prognostic values of an ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) test for detection of serum anti-*P. aeruginosa* IgG antibodies, comparing the results with the microbiological respiratory culture (current gold standard). The antibody levels were first evaluated in a cross sectional study, with 117 CF patients attended at the HC-Unicamp, seeking to evaluate the accuracy of the test, and in a parallel longitudinal study, with 78 patients initially without *P. aeruginosa* chronic infection, seeking to monitor the variation in the antibody levels in different periods of sample collection.

We observed that the seropositivity rate and the median of the anti-*Pseudomonas* IgG antibody levels were significantly higher in chronically infected patients, with the serological test presenting a sensitivity of 96.8%, specificity of 98.1%, positive predictive value of 96.8% and negative predictive value of 98.1% for detection of chronic infection. There was a progressive increase of the antibody levels in the patients over time, with greater significance, in two collection periods, among patients who presented evolution in the *P. aeruginosa* colonization/infection status. Through antibody measurement, we could detect the bacterium until 15 months before the first positive isolation in microbiological culture and the patients with elevated antibody levels in the baseline showed higher risk for later evolution in the *P. aeruginosa* colonization/infection status.

We conclude that serology can be a very useful diagnostic resource for early detection of *P. aeruginosa* pulmonary infection, complementing microbiological results. By introducing it on the follow-up routine, the early antimicrobial therapy will be possible, which will help to improve the patients' lung function and quality of life.

Keywords: cystic fibrosis, serology, *Pseudomonas aeruginosa*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. Breve histórico e epidemiologia da fibrose cística.....	2
2.2. Fisiopatogenia.....	5
2.3. Manifestações Clínicas	6
2.3.1. <i>Sintomas gastrointestinais.....</i>	<i>6</i>
2.3.2. <i>Desordens endócrinas</i>	<i>6</i>
2.3.3. <i>Reprodução</i>	<i>7</i>
2.3.4. <i>Doença pulmonar.....</i>	<i>7</i>
2.3.4.1. <i>Infecção por Pseudomonas aeruginosa.....</i>	<i>9</i>
<i>Incidência e prevalência.....</i>	<i>9</i>
<i>Infecção por P. aeruginosa e quadro clínico</i>	<i>10</i>
<i>Fatores de virulência</i>	<i>11</i>
Critérios de definição de colonização e infecção por P. aeruginosa	15
A sorologia como recurso diagnóstico para monitoramento da colonização e	
infecção por P. aeruginosa.....	17
1. <i>Valor diagnóstico e prognóstico.....</i>	<i>17</i>
2. <i>Deteção precoce da infecção por P. aeruginosa</i>	<i>18</i>
3. <i>Resultados de sorologia e estado clínico</i>	<i>20</i>
4. <i>Resposta de anticorpos frente ao tratamento da infecção</i>	<i>21</i>
5. <i>Acurácia</i>	<i>21</i>
3. OBJETIVOS	24
3.1. Objetivo geral	24
3.2. Objetivos Específicos	24

4. JUSTIFICATIVA	24
5. CASUÍSTICA	25
6. MATERIAL E MÉTODOS	26
6.1. Obtenção e cultura microbiológica de material respiratório.....	26
6.2. Sorologia para detecção de anticorpos contra <i>P. aeruginosa</i>.....	26
<i>6.2.1. Coleta de amostras</i>	<i>26</i>
<i>6.2.2. Descrição do teste ELISA indireto</i>	<i>26</i>
<i>6.2.3. Padronização do teste ELISA indireto</i>	<i>28</i>
<i>6.2.4. Desenho do estudo</i>	<i>32</i>
7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	34
8. RESULTADOS	35
8.1. Padronização do teste de ELISA	35
8.2. Resultados do estudo transversal	37
<i>8.2.1. Pacientes e grupo controle negativo</i>	<i>37</i>
<i>8.2.2. Níveis de anticorpos anti-Pseudomonas</i>	<i>38</i>
<i>8.2.3. Medidas de acurácia</i>	<i>39</i>
8.3. Resultados do estudo longitudinal.....	41
<i>8.3.1. Diferença geral dos níveis de anticorpos em quatro períodos de coleta de amostras.....</i>	<i>41</i>
<i>8.3.2. Diferença dos níveis de anticorpos de acordo com o perfil de colonização/infecção por <i>P. aeruginosa</i> no início do acompanhamento</i>	<i>42</i>
<i>8.3.3. Diferença nos níveis de anticorpos de acordo com a evolução ou não no perfil de colonização/infecção por <i>P. aeruginosa</i>.....</i>	<i>42</i>
9. DISCUSSÃO	46
10. CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXO 1.....	68
ANEXO 2	71

*À todos os pacientes com fibrose cística
do HC-Unicamp e seus pais. Sua luta e
persistência são admiráveis e nada
dessa pesquisa seria possível sem
você. Obrigado!*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à minha família, por todo o suporte, amor, carinho e incentivo dados desde o começo de minha caminhada na graduação e quando decidi entrar nessa nova etapa da pós-graduação. Indubitavelmente é uma etapa que exige paciência e trabalho árduo, com a consciência de que os resultados serão obtidos no longo prazo e o apoio de meu pai, mãe e irmã foram mais do que essenciais para que eu pudesse ter a segurança e confiança necessária. Amo vocês.

À Bia, minha namorada por todo amor e compreensão. Não é fácil conciliar um trabalho de pós-graduação com um relacionamento, menos fácil ainda quando se está distante, com toda a saudade acumulada e com a impossibilidade de ter aquele conforto nos momentos de dificuldade. Muito obrigado por ser meu porto seguro nesses momentos turbulentos. Te amo.

Ao Prof. Dr. Carlos Levy pela oportunidade e por toda a orientação que a mim foi dada durante todo o presente trabalho, além do estágio no Laboratório de Microbiologia, no qual aprendi bastante. É fundamental e gratificante ter alguém que acredite em seu potencial e que dê o maior suporte teórico e prático necessários para que um bom trabalho seja feito, e isso não faltou de sua parte. Seus conhecimentos me ensinaram bastante e, sem dúvida, irei guarda-los.

Ao Prof. Dr. Cláudio Rossi pelos ensinamentos técnicos e metodológicos, por abrir as portas de seu laboratório para que os experimentos pudessem ser realizados e pelas críticas sempre muito pertinentes e construtivas para que pudéssemos chegar à esse bom resultado.

Aos médicos-chefes do Ambulatório de Fibrose Cística do HC-Unicamp (em especial aos professores Dr. José Dirceu Ribeiro e Dr. Antônio Fernando Ribeiro, meus colaboradores), pelo acolhimento no serviço, pela paciência durante a discussão das consultas, pelo apoio constante ao trabalho, pelas sugestões feitas, pelas dúvidas levantadas e pelas várias oportunidades de apresentar os resultados.

À todas as turmas de médicos residentes da pediatria com as quais convivi durante todo esse tempo pela paciência durante minhas presenças nas consultas e pela cooperação com o estudo, sempre fazendo os pedidos de exame para que fosse possível que fossem obtidas as amostras necessárias para o desenvolvimento dessa pesquisa. Todos foram de grande e fundamental ajuda.

Às enfermeiras Cristiane, Elaine, Kazuko, Paula e Suzana, do setor de enfermagem do Ambulatório de Pediatria por toda a ajuda com as coletas de sangue, mesmo nos momentos de maior dificuldade, quando eram necessárias as coletas de crianças pequenas ou recém nascidas. Sua habilidade, paciência e boa vontade foram fundamentais e nunca irei esquecê-las, bem como não esquecerei as agradáveis conversas durante os momentos de menos movimento no ambulatório. Muitíssimo obrigado.

Ao Prof. Dr. Marcos Nolasco, por todas as reuniões (tanto presenciais quanto por videoconferência), que proporcionaram enormes esclarecimentos, tanto na interpretação clínica quanto na interpretação estatística dos dados.

Às funcionárias do serviço de estatística da FCM-Unicamp – Cleide e Juliana – por toda a análise estatística dos dados com excelente qualidade.

À todos os funcionários do Laboratório de Microbiologia do HC-Unicamp por terem me recebido tão bem durante o período de estágio, por todos os ensinamentos práticos da microbiologia laboratorial, pela disponibilização de espaço para que minhas amostras pudessem ser armazenadas e por todas as outras ajudas que não caberiam em um simples texto se fossem listadas. Agradecimento especial à Marizete Salvadego e Denise Abonicio, com as quais eu tive maior convivência e um aprendizado espetacular.

À Lisandra Suzuki, pela excelente recepção no laboratório de pesquisa, por sempre reservar o laboratório quando foi necessário, pelos ensinamentos práticos de ELISA, por tantas vezes me ajudar a economizar tempo de trabalho e, assim, poder ter tempo suficiente para me dedicar a tudo que era preciso.

Ao Prof. Dr. Antônio Gonçalves, do Ambulatório de Cirurgia Pediátrica e à Prof. Dra. Elisete Lomazi, do Ambulatório de Gastroenterologia Pediátrica, bem como às suas respectivas turmas de residentes, por abrirem as portas de seus serviços para a obtenção de soros de seus pacientes para formação do grupo controle negativo desse estudo. A contribuição que vocês deram para a pesquisa foi decisiva para que pudéssemos chegar a nossos resultados.

Aos funcionários da secretaria da Divisão de Patologia Clínica do HC-Unicamp, por toda a ajuda com assuntos burocráticos.

À toda equipe do Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da FCM-Unicamp pelo apoio acadêmico concedido, por toda a atenção quando dúvidas precisavam ser esclarecidas e pelo excelente serviço no atendimento.

Aos professores das disciplinas da pós-graduação – Prof. Barros, Prof. André, Prof. Sérgio Marba e Profa. Marluce – por todo o conhecimento transmitido nas respectivas áreas, os quais me fizeram crescer bastante.

À CAPES, pela bolsa de mestrado, remuneração com a qual pude me sustentar em Campinas e que faz todo pós graduando se sentir recompensado e reconhecido pelo seu trabalho.

Aos amigos, pela convivência, pelos ótimos momentos juntos e também pelo suporte dado nos momentos em que eu mais precisei. Não é tranquila a vida de um pós graduando e, em uma vida tão corrida, amigos com os quais se pode conversar, rir, espalhar, enfim, fazer tudo o que torna a vida mais agradável, são extremamente importantes e indispensáveis. Felizmente foram muitos que encontrei em Campinas. À todos vocês que conviveram comigo durante essa jornada, à todos vocês com os quais compartilhei ótimos momentos, vocês fazem a diferença. Muito obrigado por serem meus amigos.

Ao time de futebol americano Unicamp Eucalyptus, também composto de bons amigos, pelo acolhimento e pelos grandes momentos durante os treinos, ajudando a aliviar o stress do cotidiano de um pós-graduando.

Finalmente, um agradecimento mais que especial à todos aqueles que foram a pedra principal desse trabalho – os pacientes e pais de pacientes com fibrose cística atendidos em nosso Ambulatório. Não tenho palavras para expressar toda minha gratidão por sua compreensão, paciência e colaboração. Saibam que todo esse trabalho só foi possível por vocês e feito para vocês. Admiro sua batalha diária para lidar com uma condição tão difícil e delicada que é a fibrose cística e sua força para enfrentar todas as dificuldades que ela traz. Agradeço de coração pelo excelente relacionamento que tivemos (e felizmente continuaremos a ter) e por tudo o que fizeram por mim e pela pesquisa. A doença pulmonar é a manifestação mais preocupante na fibrose cística e, mais importante que buscar a cura dessa doença é buscar o diagnóstico precoce. E espero retribuir tudo com os resultados dessa pesquisa, os quais serão determinantes para a inclusão da sorologia na rotina diagnóstica e de grande ajuda para detectar a infecção pulmonar o mais cedo possível, permitindo um tratamento precoce e prolongando a função pulmonar de todos os pacientes, melhorando sua qualidade de vida. Essa pesquisa é para vocês. Desejo tudo de melhor a todos os pacientes e suas respectivas famílias e fico extremamente feliz em ajudá-los a ter uma vida melhor. Vocês são incríveis! Meu eterno agradecimento.

Abreviação/sigla	Significado
AMP	Adenosina Monofosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator
CIE	Contraímunoeletroforese
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
DRFC	Diabetes Relacionado à Fibrose Cística
ELA	Elastase
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ExoA	Exotoxina A
ExoS	Exotoxina S
ExoT	Exotoxina T
ExoU	Exotoxina U
F508del	Ausência de Fenilalanina na posição 508 do gene CFTR
FC	Fibrose Cística
IgA	Anticorpo Imunoglobulina A
IgG	Anticorpo Imunoglobulina G
IgM	Anticorpo Imunoglobulina M
LBA	Lavado Broncoalveolar
LPS	Lipopolissacarídeo
PA	Protease Alcalina
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
ROC	Receiver Operating Characteristics
RPM	Rotações Por Minuto
SSTT	Sistema de Secreção Tipo III
UA/mL	Unidades Arbitrárias por mililitro
v/v	Volume por volume
VPN	Valor Preditivo Negativo
VPP	Valor Preditivo Positivo

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

TABELA 1: CLASSES DE MUTAÇÕES NO GENE CFTR.....	04
TABELA 2: ESTUDOS AVALIANDO A UTILIDADE DIAGNÓSTICA DA SOROLOGIA PARA PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA DIFERENTES ANTÍGENOS DE <i>P. aeruginosa</i> EM PACIENTES COM FC. CASUÍSTICAS, FAIXAS ETÁRIAS E MÉTODOS UTILIZADOS NOS ESTUDOS.....	18
TABELA 3: ESTUDOS AVALIANDO A ACURÁCIA DA SOROLOGIA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA DIFERENTES ANTÍGENOS DE <i>P. aeruginosa</i> POR MEIO DA TÉCNICA DE ELISA.....	23
TABELA 4: EXEMPLO DE VALORES UTILIZADOS PARA CONSTRUÇÃO DE CURVA DE CALIBRAÇÃO UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE UM ANTISSORO PADRÃO HUMANO.....	32
TABELA 5: TABELA DE CONTINGÊNCIA PADRÃO PARA CÁLCULO DE SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, VPP E VPN.....	35
TABELA 6: DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SORO A SER UTILIZADA NO ESTUDO.....	36
TABELA 7: a) PACIENTES COM FC SEPARADOS POR PERFIS DE COLONIZAÇÃO/INFECÇÃO POR <i>P. aeruginosa</i> E GRUPO CONTROLE NEGATIVO – IDADE E SEXO DE TODOS OS GRUPOS. b) PACIENTES COM FC E GRUPO CONTROLE NEGATIVO – NÍVEIS DE ANTICORPOS EM CADA GRUPO.....	37
TABELA 8: NÍVEIS DE ANTICORPOS DE ACORDO COM A PRESENÇA OU AUSÊNCIA	

DE <i>P. aeruginosa</i> MUCÓIDE EM CULTURA MICROBIOLÓGICA.....	39
TABELA 9: a) MEDIDAS DE ACURÁCIA DO TESTE. b) PORCENTAGEM DE INDIVÍDUOS COM SOROLOGIA POSITIVA E SOROLOGIA NEGATIVA NOS GRUPOS DE PACIENTES COM FC E COLONIZAÇÃO INTERMITENTE, LIVRES DE INFECÇÃO E NUNA COLONIZADOS.....	40
TABELA 10: DIFERENÇA NOS NÍVEIS DE ANTICORPOS EM QUATRO DIFERENTES PERÍODOS DE COLETA DE AMOSTRAS, CONSIDERANDO TODOS OS PACIENTES INCLUÍDOS NO ESTUDO LONGITUDINAL.....	42
TABELA 11: DIFERENÇA NOS NÍVEIS DE ANTICORPOS EM QUATRO PERÍODOS DE COLETA DE AMOSTRAS DE ACORDO COM O PERFIL DE COLONIZAÇÃO/INFECÇÃO POR <i>P. aeruginosa</i> NO INÍCIO DO ESTUDO LONGITUDINAL.....	43
TABELA 12: DIFERENÇA NOS NÍVEIS DE ANTICORPOS DE ACORDO COM A EVOLUÇÃO OU NÃO DO PERFIL DE COLONIZAÇÃO/INFECÇÃO POR <i>P. aeruginosa</i> NO DECORRER DO ESTUDO LONGITUDINAL.....	43
TABELA 13: DIFERENÇA NOS NÍVEIS DE ANTICORPOS ENTRE PACIENTES QUE ADQUIRIRAM OU NÃO INFECÇÃO CRÔNICA POR <i>P. aeruginosa</i>	45
 FIGURA 1: PREVALÊNCIA DE FIBROSE CÍSTICA AO NASCER E MUTAÇÕES MAIS COMUNS DE ACORDO COM CADA PAÍS AVALIADO.....	 04
FIGURA 2: IDADE APROXIMADA DE ESTABELECIMENTO DAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA FIBROSE CÍSTICA.....	05
FIGURA 3: COLONIZAÇÃO/INFECÇÃO PULMONAR BACTERIANA NA FIBROSE	

CÍSTICA – TENDÊNCIA DE ACORDO COM A IDADE.....	11
FIGURA 4: FENÓTIPO MUCÓIDE DE <i>P. aeruginosa</i> (À ESQUERDA) COMPARADO COM O FENÓTIPO NÃO MUCÓIDE (À DIREITA).....	12
FIGURA 5: TÉCNICA DE ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	28
FIGURA 6: EXEMPLO DE CURVA DE CALIBRAÇÃO CONSTRUÍDA COM A UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANTÍSSORO PADRÃO HUMANO.....	32
FIGURA 7: DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO ÓTIMA DE ANTÍGENO A SER UTILIZADA NO TESTE.....	36
FIGURA 8: DETERMINAÇÃO DA DILUIÇÃO ÓTIMA DO CONJUGADO A SER UTILIZADA NO TESTE.....	36
FIGURA 9: CURVA ROC PARA DETERMINAÇÃO DO PONTO DE CORTE PARA O MÉTODO.....	40
FIGURA 10: DIFERENÇAS NA DISTRIBUIÇÃO DOS NÍVEIS DE ANTICORPOS ENTRE OS GRUPOS DE SUJEITOS AVALIADOS NO ESTUDO (PACIENTES COM FC E GRUPO CONTROLE).....	41
FIGURA 11: GRÁFICO (ESCALA LOGARÍTMICA) DA DISTRIBUIÇÃO DOS NÍVEIS DE ANTICORPOS EM QUATRO DIFERENTES PERÍODOS DE COLETA DE AMOSTRAS, CONSIDERANDO TODOS OS PACIENTES INCLUÍDOS NO ESTUDO LONGITUDINAL. A LINHA PONTILHADA REPRESENTA O VALOR DE CORTE ESTABELECIDO PARA O MÉTODO (15,3 U/mL).....	45

1. INTRODUÇÃO

A fibrose cística (FC) é uma doença hereditária, causada por uma mutação em um gene que codifica a proteína reguladora da condutância transmembrana (CFTR), a qual é expressa em muitas células epiteliais e sanguíneas. Essa proteína é essencial para o transporte de íons pela membrana celular, estando envolvida na regulação do fluxo de cloro, sódio e água (1). A FC é caracterizada pelo comprometimento sistêmico das glândulas exócrinas e, na maioria dos pacientes, a doença pulmonar é o local preponderante das manifestações. Ocorre a desidratação das secreções respiratórias com o aumento acentuado da viscosidade, o que dificulta o transporte mucociliar, evoluindo para obstrução crônica das vias aeríferas inferiores com a colonização bacteriana seguida de infecções recorrentes, mesmo que o paciente com FC tenha uma resposta imune adequada (2,3).

A *Pseudomonas aeruginosa* é a bactéria de maior relevância para os pacientes com FC (2,3). A infecção pulmonar crônica por *P. aeruginosa* é responsável por elevada morbidade e mortalidade desses pacientes. Na infância, 10 a 30% dos pacientes com FC estão colonizados e na vida adulta, 80 a 90% estão infectados. Em geral, pacientes com infecção pulmonar por *P. aeruginosa* apresentam uma redução da expectativa de vida de cerca de 10 anos, quando comparadas com os não infectados (4-6).

A detecção da infecção por *P. aeruginosa* na rotina diagnóstica é feita preferencialmente por meio da cultura de escarro – expectorado espontaneamente ou com expectoração induzida por solução salina hipertônica; entretanto, muitos pacientes, especialmente crianças menores de sete anos de idade, são incapazes de expectorar um material representativo. A cultura do lavado broncoalveolar (LBA) é uma opção, porém trata-se de um procedimento invasivo e pouco empregado. Por tal razão, a cultura de material respiratório obtido por swab de orofaringe é usada como método alternativo à cultura de escarro ou LBA nesses indivíduos, realizando a amostragem da microbiota do trato respiratório superior (7). Apesar da boa especificidade relatada para esse método, em comparação com a cultura de LBA, é sabido que uma cultura negativa das vias aeríferas superiores não exclui a presença de *P. aeruginosa* nas vias aeríferas inferiores (5,8). Erros de amostragem durante o LBA e as amostras frequentemente insuficientes obtidas por meio

do swab de orofaringe podem levar à ocorrência de resultados falsos negativos (8). A dificuldade em obter amostras representativas das vias aeríferas de crianças pequenas indica a necessidade do uso de métodos que possam complementar ou ser uma alternativa à cultura microbiológica de material respiratório (9).

A detecção de anticorpos séricos contra *P. aeruginosa* tem surgido como um recurso para detecção precoce e terapia de erradicação (10,11). Métodos altamente sensíveis para a detecção de anticorpos contra vários antígenos de *P. aeruginosa* podem complementar os métodos de monitoramento atualmente utilizados. Níveis aumentados de anticorpos quando há cultura negativa de material respiratório devem alertar os profissionais de saúde na busca por uma provável infecção. Altos níveis de anticorpos estão associados com uma maior probabilidade de infecção crônica por *P. aeruginosa* e podem ser uma ferramenta útil para clínicos e pesquisadores em FC no monitoramento de pacientes com risco de infecção (9).

Neste estudo, buscamos padronizar e avaliar o valor diagnóstico e prognóstico de um teste de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) para pesquisa de anticorpos séricos IgG anti-*P. aeruginosa*, comparando os resultados com a cultura microbiológica de material respiratório (padrão-ouro atual), além de iniciar um monitoramento sorológico da resposta de anticorpos nesses pacientes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Breve histórico e Epidemiologia da Fibrose Cística

Nos primeiros anos do século XX, clínicos e patologistas já reconheciam um padrão de manifestações mórbidas em crianças de origem caucasiana que levava à morte e se caracterizava por disfunção múltipla de glândulas exócrinas. A denominação dessa condição variava: fibrose cística do pâncreas, enfatizando uma das manifestações mais proeminentes da doença, ou seja, a destruição do pâncreas; mucoviscidose, isto é, a produção de muco com características alteradas, como aumento da densidade e da

viscosidade, no trato respiratório, no sistema digestório e em outros locais em que a produção de muco é necessária para o funcionamento adequado do órgão. Durante a Segunda Guerra Mundial, reconheceu-se que a fibrose cística repetia-se em famílias e foi proposto que se tratava de herança mendeliana recessiva (12,13).

A fibrose cística é um distúrbio autossômico recessivo causado por mutações em um único gene de 230 kb no braço longo do cromossomo 7, o qual codifica um polipeptídeo de 1480 aminoácidos denominado proteína reguladora da condutância transmembrana (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator – CFTR). Tal proteína atua principalmente como um canal de cloreto nas membranas epiteliais e, em condições normais, regula o fluxo de íons através do epitélio para adequada manutenção da composição iônica e do volume do fluido de superfície, tendo também outras funções regulatórias, incluindo a inibição do transporte de sódio através do canal de sódio epitelial, regulação de canais de ATP, regulação do transporte vesicular intracelular, acidificação de organelas intracelulares e inibição de canais de cloreto ativados por cálcio (1,2,14). A FC é a doença autossômica recessiva mais comum entre indivíduos caucasianos, sendo mais comum em populações do norte da Europa, entre os quais ocorre em aproximadamente um indivíduo a cada 3000 nascidos vivos (1). Nos Estados Unidos, essa proporção é de um para 3200. A incidência em populações Hispânicas, Asiáticas e Afroamericanas é de 1:9000, 1:32000 e 1:15000, respectivamente (1,15) (Figura 1). No Brasil, a prevalência varia de 1:3500 a 1:10000, o que pode ser explicado pelo variado grau de miscigenação encontrado no país (12). Em geral, cerca de 60 mil indivíduos em todo mundo são portadores da FC e a estimativa é de que 10 milhões são portadores do gene (16,17). Apesar da melhora no tratamento nos últimos anos, a média de idade de sobrevivência na FC é de aproximadamente 39 anos (18).

Mais de 1500 mutações da CFTR foram identificadas, sendo essas divididas em seis classes (Tabela 1), mas apenas a importância funcional de um pequeno número é conhecida. A ausência de fenilalanina na posição 508 (F508del), uma mutação de classe II, corresponde a cerca de 70% dos alelos mutantes nas populações dos Estados Unidos e Europa. Apesar de a mutação na CFTR variar de população para população, em todo o planeta, nenhuma outra mutação corresponde a mais do que aproximadamente 5% das mutações na CFTR (19-21).

Tabela 1: Classes de mutações no gene CFTR

Classe de Mutação	Efeito na proteína CFTR	Presença de CFTR funcional
Classe I	Não há produção da proteína	Não
Classe II	Defeito no tráfego da proteína; degradação no retículo endoplasmático/aparelho de Golgi	Não/substancialmente reduzida
Classe III	Regulação deficiente; CFTR não ativada por ATP ou AMP cíclico	Não
Classe IV	Transporte de íons cloreto através da CFTR reduzido na membrana celular	Sim
Classe V	Defeito no <i>splicing</i> , com produção diminuída de CFTR normal	Sim
Classe VI	<i>Turnover</i> acelerado, apesar de a CFTR chegar normalmente à membrana celular	Sim

Adaptado de O'Sullivan e Freedman, 2009 (1) e Strausbaugh e Davis, 2007 (19).

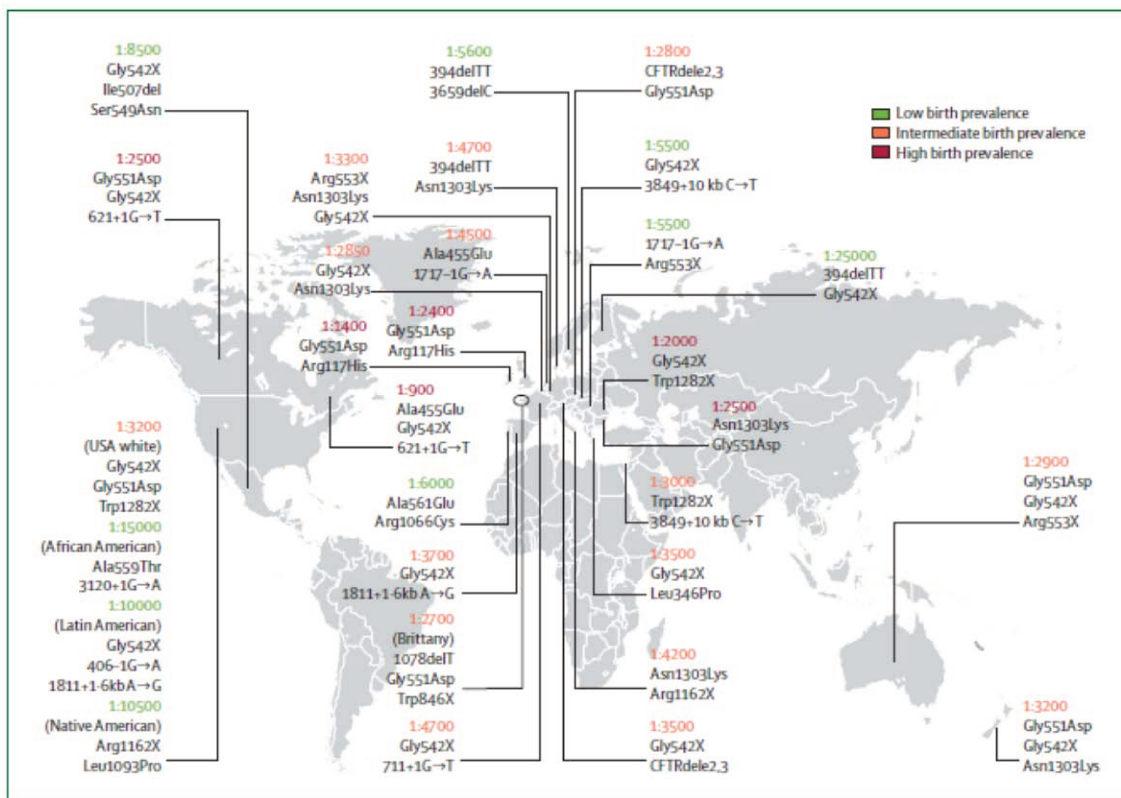


Figura 1: Prevalência de fibrose cística ao nascer e mutações mais comuns de acordo com cada país selecionado (Extraído de O'Sullivan e Freedman, 2009 – referência 1).

2.2. Fisiopatogenia

A presença de dois alelos com mutações no gene da FC provoca ausência de atividade ou funcionamento parcial da CFTR, causando redução no transporte de cloro e aumento da eletronegatividade intracelular, resultando em maior fluxo de sódio para preservar o equilíbrio eletroquímico e, secundariamente, de água para a célula por ação osmótica. Desse modo, ocorre a desidratação das secreções mucosas e aumento da viscosidade, favorecendo a obstrução dos ductos acompanhada de reação inflamatória e posterior processo de fibrose. O defeito básico acomete células de vários órgãos e nem todos os indivíduos expressam respostas clínicas semelhantes, com uma grande variabilidade de sintomas de paciente para paciente (**Figura 2**). As manifestações clínicas podem ser muito variáveis e ocorrer precocemente, ou na vida adulta (22).

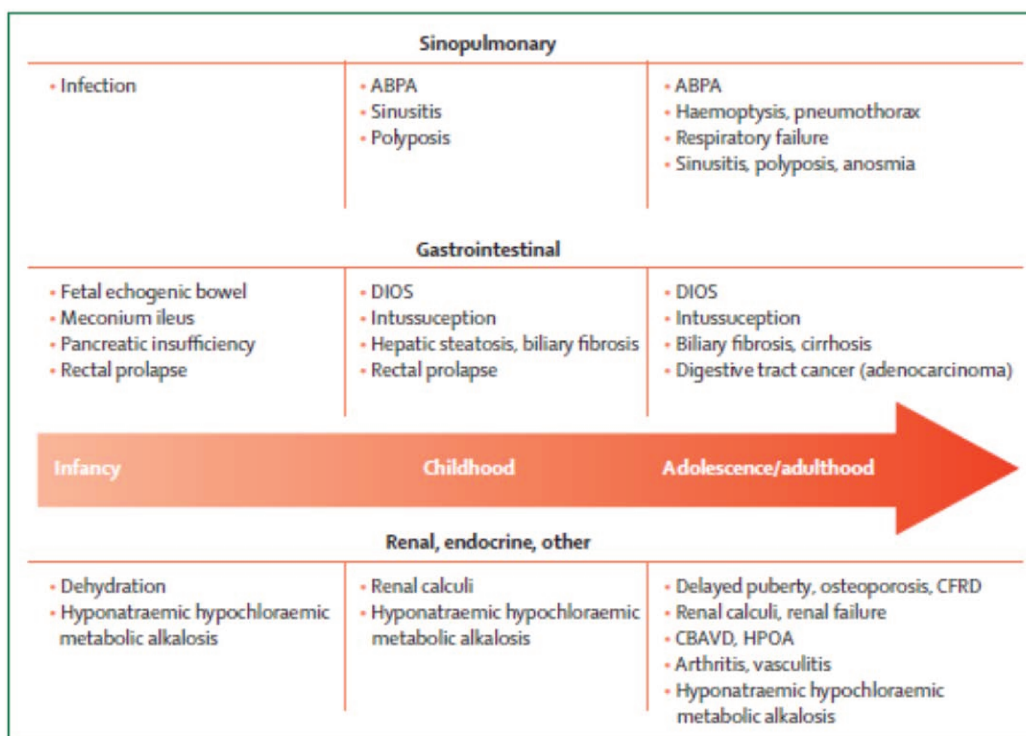


Figura 2: Idade aproximada de estabelecimento das manifestações clínicas na fibrose cística (Adaptado de O'Sullivan e Freedman, 2009 – referência 1)

ABPA = aspergilose broncopulmonar alérgica; **CBAVD** = ausência bilateral congênita do canal deferente; **CFRD** = diabetes relacionado à fibrose cística; **DIOS** = síndrome de obstrução intestinal distal; **HPOA** = osteoartrite pulmonar hipertrófica

2.3. Manifestações Clínicas

2.3.1. Sintomas gastrointestinais

Cerca de 15 a 20% das crianças com FC nascem com íleo meconial, uma condição obstrutiva secundária na qual há um bloqueio do trânsito intestinal intra-uterino ao nível do íleo distal, levando à um espessamento do material, caracterizado pela presença de mecônio e muco espesso. (1,18). Por volta de 85 a 90% das crianças desenvolvem insuficiência pancreática, que pode estar presente ao nascimento ou aparecer durante o primeiro ano de vida com sinais típicos, como fezes gordurosas, flatulência, inchaço abdominal e baixo ganho de peso. A insuficiência pancreática leva à esteatorreia, deficiência de vitaminas lipossolúveis e subnutrição. Com a introdução da terapia com enzimas pancreáticas, a subnutrição se tornou manejável; entretanto, a ingestão calórica adequada e a correção das deficiências de vitaminas lipossolúveis permanecem como componentes cruciais do controle da doença (23). Secreções intestinais espessas, má absorção e motilidade intestinal reduzida podem levar a obstruções intestinais ou constipação crônica em pacientes de mais idade. A má absorção de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) pode levar a acrodermatite, anemia, neuropatia, cegueira noturna, osteoporose e desordens sanguíneas (1).

Pacientes com FC compõem um grupo de risco para cirrose biliar focal causada por obstrução dos dutos biliares intra-hepáticos, mas a cirrose clinicamente aparente ocorre em cerca de apenas 5% dos pacientes e normalmente se apresenta aos 15 anos de idade (24).

2.3.2. Desordens endócrinas

A disfunção pancreática é causada por obstrução dos dutos intra-pancreáticos com secreções espessas. Com o tempo, o pâncreas sofre autólise, com substituição do tecido por gordura. Quando uma certa proporção das ilhotas pancreáticas não funciona mais, o paciente desenvolve insuficiência de insulina e intolerância à carboidratos, possivelmente coexistindo com resistência à insulina (25,26). O diabetes mellitus relacionado à FC (DRFC) não é como os típicos diabetes do tipo I ou II. Vários fatores inerentes à FC afetam o metabolismo da glicose, tais como o gasto de energia aumentado, deficiência de

glucagon, disfunção hepática, tempo de trânsito intestinal diminuído e trabalho respiratório aumentado (25). À medida que o paciente com FC envelhece, aumenta a probabilidade de desenvolvimento do DRFC; é relatada uma porcentagem de 30% de pacientes com idade próxima aos 25 anos que apresentam essa condição (1).

A osteoporose secundária à deficiência de vitamina D, inflamação sistêmica crônica e uso intermitente de corticosteróides está sendo cada vez mais reconhecida como uma complicação da FC. A osteopenia tem início na infância, mas geralmente se manifesta na idade adulta. A reabsorção óssea excede a formação óssea até mesmo em pacientes bem nutridos e clinicamente estáveis (27).

2.3.3. Reprodução

O canal deferente é muito sensível à disfunção da CFTR. Praticamente, todos os homens com fibrose cística clássica têm azospermia e são inférteis por conta da ausência bilateral congênita do canal deferente, o que também pode ser visto em homens com apenas uma mutação na CFTR e sem outras manifestações da FC (28,29). Mulheres com FC são férteis. Apesar de haver controvérsias sobre os efeitos da gravidez na FC, o consenso é que uma mulher que tenha reserva nutricional e função pulmonar adequadas pode completar o prazo da gravidez com sucesso (30).

2.3.4. Doença pulmonar

A maior morbidade e mortalidade na FC resultam da doença pulmonar (1,2). No trato respiratório, a FC é uma doença que causa desidratação do líquido periciliar das vias aeríferas, com alterações significativas no muco e no *clearance* mucociliar (31, 32). A ausência da CFTR leva ao defeito na secreção de cloreto e à absorção de sódio inadequada, resultando em desidratação e diminuição do tamanho da camada de líquido periciliar, com consequente espessamento do muco, causando colapso dos cílios. O muco aderente e retido pode desencadear resposta inflamatória e promover ambiente ideal para proliferação de bactérias (12). Os pulmões de crianças com FC são aparentemente normais

no nascimento (1), porém, como resultado do colapso das vias aeríferas, microrganismos que adentram as vias aeríferas distais não são depurados. Crianças com FC, diferente de crianças saudáveis, desenvolvem pneumonias bacterianas, as quais são tratadas por meio de terapia antimicrobiana, mas ocorre colonização permanente das vias aeríferas por conta do muco espesso e concentrado, levando à inflamação progressiva e insuficiência respiratória, com sintomas diários como tosse, febre e produção de muco. A infecção das vias aeríferas leva a uma resposta inflamatória marcante e persistente, mediada por neutrófilos, que destrói as vias aeríferas menores (1,19). Há episódios intermitentes de piora aguda dos sintomas, mais comumente referidos como exacerbações pulmonares e, em casos mais graves, infecções crônicas das vias aeríferas, progredindo para bronquiectasias, aprisionamento de ar, hipoxemia e hipercapnia. A insuficiência pulmonar é responsável por pelo menos 80% das mortes relacionadas à FC (1,2,22,33,34).

A colonização pulmonar na FC ocorre com um distinto espectro de patógenos bacterianos que são frequentemente adquiridos de uma forma dependente da idade (**Figura 3**). Cronologicamente, essas infecções pulmonares se desenvolvem precocemente, com *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae* como patógenos predominantes. A infecção com vários morfotipos de *Pseudomonas aeruginosa* logo se segue, resultando em morbidade significativa à medida que a resposta inflamatória progride. A *P. aeruginosa* se torna o patógeno mais comum, afetando aproximadamente 80% da população de pacientes com FC (19). Outros patógenos, tais como *Stenotrophomonas maltophilia* e *Achromobacter xylosoxidans* podem estar presentes, porém seu impacto clínico ainda não é totalmente conhecido (19,34,35)

O complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc) aparece com pior prognóstico para o paciente. Alguns pacientes que adquirem *B. cepacia* desenvolvem uma síndrome semelhante à sepse, com pneumonia necrotizante grave, chamada síndrome cepácia, com rápida deterioração pulmonar levando à morte. Outros pacientes infectados por *B. cepacia* têm um curso menos dramático, apesar de apresentarem declínio mais rápido da função pulmonar e taxa mais alta de mortalidade do que aqueles infectados apenas por *P. aeruginosa*. Dos nove genótipos dentro do Bcc, o genótipo III (*B. cenocepacia*) é o mais frequentemente associado com síndrome cepácia (19).

Colonizações/infecções pulmonares fúngicas também são comuns na FC. Fungos do gênero *Aspergillus* são isolados em cerca 25% dos pacientes e podem estar associados com doença pulmonar. A aspergilose invasiva, apesar de rara, é frequentemente fatal. A aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) é mais comum, com uma incidência de 3,2% para pacientes menores de 18 anos e 5,2% para pacientes maiores de 18 anos de idade. A ABPA é causada por uma reação alérgica intensa mediada pela imunoglobulina E (IgE) contra antígenos fúngicos e é caracterizada por chiados, infiltrados pulmonares, bronquiectasias e fibrose (19,34,35).

Cerca de 13% dos pacientes adultos são colonizados ou infectados por micobactérias não-tuberculose, mais comumente por microorganismos do complexo *Mycobacterium avium* (72%) ou *M. abscessus* (16%). Tem sido evidenciado que tais agentes podem causar declínio da função pulmonar, mas de uma forma não tão intensa como em infecções por *B. cepacia* e *P. aeruginosa* (19,34).

2.3.4.1. Infecção por *Pseudomonas aeruginosa*

Incidência e prevalência

A *P. aeruginosa* é a espécie bacteriana mais comum envolvida na infecção do trato respiratório em pacientes com FC. Nos Estados Unidos, foi relatado que cerca de 50% dos pacientes incluídos no registro da Cystic Fibrosis Foundation tiveram *P. aeruginosa* cultivada em escarro (36). A prevalência da infecção varia significativamente com a idade, na faixa de aproximadamente 25% em crianças menores de cinco anos de idade a 80% em adultos de 25 a 34 anos de idade (**Figura 3**). Entretanto, parece haver um declínio nessa prevalência. Em análise recente (37), foi relatada uma queda de 60,4% em 1995 para 56,1% em 2005. A incidência geral de infecção não mudou durante este intervalo; entretanto, aumentos significativos na incidência de infecção por *P. aeruginosa* foram observados em crianças menores de um ano e de dois a cinco anos de idade. Em contraste, outra análise recente não mostra um aumento significativo na prevalência em pacientes com FC adultos no Reino Unido entre 1985 e 2005 (38).

O modo específico de aquisição da infecção por *P. aeruginosa* não é totalmente conhecido. Análises genéticas têm mostrado que as cepas colonizadoras iniciais são, em

maioria, únicas e originam-se de reservatórios ambientais não identificados. No entanto, a transmissão das cepas entre pacientes pode ocorrer, dependendo da frequência do encontro entre pacientes. A infecção crônica das vias aeríferas por *P. aeruginosa* é normalmente antecedida por um período de colonização recorrente e intermitente. Nesta fase, que pode durar do nascimento até a aquisição da infecção crônica, as infecções podem ser efetivamente combatidas com terapia antimicrobiana agressiva, e isso pode postergar a infecção crônica subsequente. O paciente tem infecções repetidas com frequência, após um certo período, com outras cepas de *P. aeruginosa* de diferentes genótipos, mas em aproximadamente 25% dos casos de colonização recorrente podem resultar de fontes ambientais persistentes ou reservatório não detectado no paciente, o que pode incluir os seios paranasais, que constituem um nicho protetor, a partir do qual a *P. aeruginosa* pode colonizar novamente os pulmões (39).

Infecção por P. aeruginosa e quadro clínico

É sabido que a infecção por *P. aeruginosa* na FC está associada com pior prognóstico. Em um dos estudos pioneiros (40), foram seguidas 117 crianças cujo estado da infecção por *P. aeruginosa* foi previamente estabelecido. De 31 crianças que estavam infectadas pela bactéria, apenas 53% sobreviveu até a idade de 16 anos, enquanto 84% daquelas que não estavam infectadas sobreviveu até essa idade. A sobrevivência foi pior entre os pacientes que adquiriram a infecção em uma idade menor. Outros estudos, subsequentemente, confirmaram a associação entre infecção por *P. aeruginosa* e mortalidade (41-44). Além da menor sobrevida, a infecção por *P. aeruginosa* está associada com pior função pulmonar (45-50), pior escore de imagens radiológicas (45,47,51-53), crescimento diminuído do paciente (42,53) e frequência aumentada de tosse diária (51).

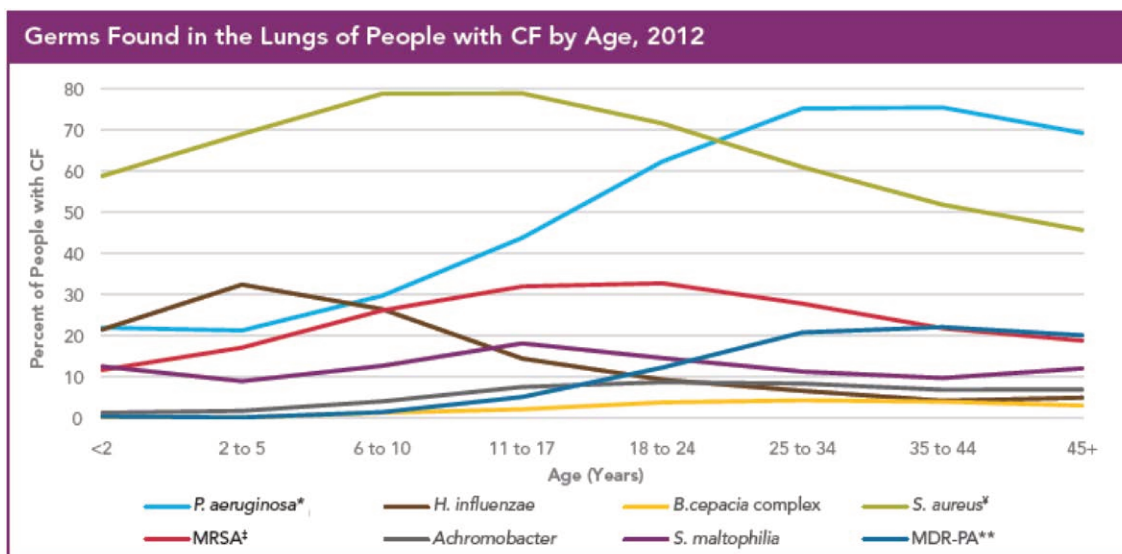


Figura 3: Colonização/infecção pulmonar bacteriana na fibrose cística - tendência de acordo com a idade (extraído de: Cystic Fibrosis Foundation, EUA – 2012; Annual data report to the center directors; Cystic fibrosis patients registry, Bethesda, MD; utilizado com permissão).

**P. aeruginosa* inclui pacientes com *P. aeruginosa* multiresistente; **MDR-PA = *P. aeruginosa* multiresistente; †*S. aureus* inclui pacientes com MRSA; ‡MRSA = *S. aureus* resistente à metilina

Fatores de virulência

A mudança que ocorre quando a *P. aeruginosa* passa do meio ambiente para as vias aeríferas do paciente com FC envolve características tanto nutricionais quanto físico-químicas para a bactéria, que deve sobreviver e se adaptar a condições de alto nível de estresse que têm efeitos fundamentais em sua evolução subsequente. Quando a *P. aeruginosa* encontra tais situações, como a ação de antimicrobianos ou o estresse oxidativo, ocorre uma transição no perfil de expressão gênica (39). Apesar de a infecção inicial ser facilitada pelo vasto genoma da *P. aeruginosa* e sua habilidade de responder a uma grande variedade de condições ambientais, a adaptação tardia resulta, pelo menos em parte, na seleção de linhagens clonais contendo mutações espontâneas, resultando em gerações de diversas linhagens, muitas das quais exibem fenótipos alterados (7,39). Alguns exemplos de tais alterações são:

- (i) **Fenótipo mucóide:** é a adaptação mais estudada na *P. aeruginosa*. Em 1963, foi notado que isolados de *P. aeruginosa* do trato respiratório de pacientes com FC

exibiam com frequência uma “variante muito mucóide”. A morfologia mucóide ocorre devido à produção do exopolissacarídeo alginato, um polímero de ácido D-manurônico e L-gulurônico (55,56) (**Figura 4**). O fenótipo mucóide é relativamente comum em amostras respiratórias de pacientes com FC, emergindo por volta de três anos após o início da infecção e em uma mediana de idade de 13 anos (7), embora já tenha sido observado em três meses após a infecção (57,58). A superprodução de alginato é vantajosa para a *P. aeruginosa* de diversas maneiras: aumento na formação do biofilme, prevenindo o *clearance* bacteriano, tanto pelos fagócitos do sistema imune quanto por meio de antibioticoterapia; impedimento da opsonização, fagocitose e morte da célula; propriedades imunomoduladoras, podendo levar a uma resposta imune desregulada (7,55,56). Alguns estudos sugerem que o aparecimento do fenótipo mucóide coincide com a transição da colonização intermitente para a infecção crônica por *P. aeruginosa* (59-61), enquanto outros sugerem que a infecção crônica normalmente precede o aparecimento do fenótipo mucóide (62). Apesar das distinções, é sabido que a infecção crônica com a presença do fenótipo mucóide está associada com piores quadros clínicos em pacientes com FC (7,63-65).

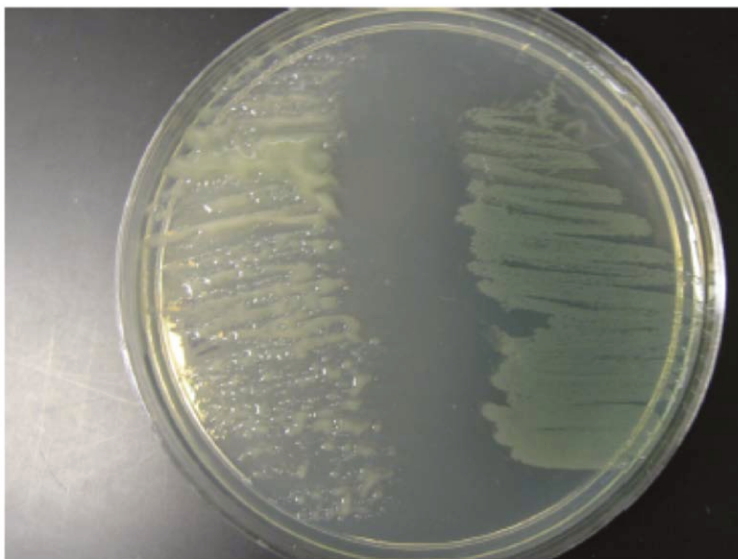


Figura 4: Fenótipo mucóide de *P. aeruginosa* (à esquerda) comparado com o fenótipo não-mucóide (à direita) (Extraído de Hauser *et al.*, 2011 – referência 7).

- (ii) Resistência a antimicrobianos:** Por conta do tempo prolongado durante o qual a *P. aeruginosa* habita as vias respiratórias de pacientes com FC e dos repetidos cursos de antibióticos ao qual ela é exposta, a resistência microbiana é comum (7). As mutações ocorrem frequentemente nos genes controladores da produção de bombas de efluxo e beta-lactamases (66), criando linhagens resistentes de *P. aeruginosa* que se expandem sob a pressão seletiva da terapia antimicrobiana. Não é totalmente claro se a infecção com cepas altamente resistentes está associada com piores consequências e, surpreendentemente, poucos estudos abordam essa questão (7).
- (iii) Modificação do LPS:** Bactérias gram-negativas como a *P. aeruginosa* são envoltas por uma membrana externa, a qual possui um revestimento externo composto majoritariamente por lipopolissacarídeo (LPS). Dada a localização estrategicamente importante do LPS na interface da *P. aeruginosa* com o ambiente pulmonar, não é surpresa que tal estrutura seja modificada em isolados de *P. aeruginosa* em material respiratório na FC. Não há dados atualmente disponíveis que abordem o impacto das alterações do LPS sobre os efeitos clínicos de pacientes com FC, apesar de um estudo ter relatado que o lipídio A hepta-acilado (porção do LPS) foi encontrado apenas em cepas de *P. aeruginosa* obtidas de pacientes com infecção crônica em estágio grave (67).
- (iv) Perda do Sistema de Secreção Tipo III (SSTT):** A maioria dos isolados de *P. aeruginosa* do ambiente e de infecções agudas tem a habilidade de secretar proteínas como ExoS, ExoT, ExoU, PopB e PopD, que compõem um sistema de proteínas que causam citotoxicidade, conhecidas como SSTT (1-3,7). A maioria das cepas de *P. aeruginosa* isoladas em pacientes com infecção aguda, pneumonia e bacteremia hospitalar é SSTT negativa. Entretanto, a prevalência do fenótipo SSTT positivo parece ser significativamente maior em pacientes sem FC com infecção aguda do que em pacientes com FC cronicamente

infectados por *P. aeruginosa* (68). Jain *et al.* (69) detectaram a produção de pelo menos uma das proteínas do SSTT em 32% das cepas de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes com FC crônicos para *P. aeruginosa*. Em análise por faixa etária e duração da infecção, observou-se que a frequência de *P. aeruginosa* SSTT positiva declina com a idade e cronicidade da infecção. Estes dados sugerem que as cepas de *P. aeruginosa* mudam gradualmente do fenótipo SSTT positivo para SSTT negativo durante a evolução do processo infeccioso. A infecção aguda com *P. aeruginosa* SSTT positiva ativa o sistema imune, induz a produção de anticorpos específicos para estas proteínas, mas é insuficiente para impedir a evolução do quadro de infecção pulmonar crônica.

(v) Perda de motilidade: A perda de motilidade ocorre durante o curso da infecção, já que durante a infecção, as cepas de *P. aeruginosa* isoladas são móveis (70). A base para essa perda gradual de motilidade parece estar relacionada à aquisição de mutações em um de vários genes que regulam a produção tardia de flagelos (66). As pressões seletivas que levam a tal adaptação podem incluir a resistência à fagocitose (70) ou reconhecimento imune diminuído pelo receptor toll-like TLR5, que reconhece a flagelina e sinaliza para a regulação da resposta imune proinflamatória (71-73). Não se sabe se a perda de motilidade leva a um pior estado clínico em pacientes com FC. Um estudo (74) mostrou que isolados de pacientes com doença pulmonar em estágio avançado apresentaram maior probabilidade de possuir defeitos na motilidade e perda de flagelos, mas isso pode simplesmente refletir os longos tempos durante os quais essas cepas habitaram o ambiente pulmonar e sofreram adaptações.

(vi) Auxotrofia e adaptações metabólicas: isolados respiratórios de *P. aeruginosa* de pacientes com FC frequentemente crescem vagarosamente em meios de cultura laboratoriais definidos, sugerindo a presença de vias metabólicas deficientes, sendo incapazes de crescer em meio com ausência de suplementos não requeridos por cepas do tipo selvagem (prototróficas) (75). Dois estudos

sugeriram que cepas auxotróficas estão associadas com exacerbações ou doença pulmonar mais grave na FC (76,77).

- (vii) **Quorum-sensing:** Quorum-sensing é um mecanismo pelo qual as bactérias de uma determinada espécie se comunicam umas com as outras por meio de expressão gênica em resposta a mudanças na densidade populacional (78). Para realizar esse mecanismo, as bactérias secretam moléculas denominadas autoindutores, cujas concentrações são detectadas por outras bactérias dentro da população. *In vitro*, os sistemas de quorum-sensing modulam a expressão de 6 a 10% dos genes no genoma da *P. aeruginosa* (79,80), incluindo vários que codificam importantes fatores de virulência, tais como elastase (ELA), protease alcalina (PA), fosfolipase C, piocianina e exotoxina A (ExoA) (81-84). É sabido que esse sistema desempenha um importante papel na patogênese na infecção pulmonar por *P. aeruginosa* na FC por meio de sua regulação dos fatores de virulência e promoção da formação de biofilme.

Critérios de definição de colonização e infecção por Pseudomonas aeruginosa

Atualmente não há uma definição universal aceitável de infecção crônica por *P. aeruginosa*. A maioria das definições utilizadas é baseada em resultados microbiológicos de cultura de escarro. Entretanto, a acurácia de qualquer definição que se baseia em resultados de cultura depende da frequência de determinações microbiológicas de secreções do trato respiratório de pacientes com FC (85).

A infecção crônica pode ser definida como uma infecção persistente, apesar da terapia com antimicrobianos e da resposta imune e inflamatória do paciente. Além disso, em contraste com a colonização bacteriana, a infecção crônica é caracterizada por resposta imune persistente e progressão da doença pulmonar (85). As seguintes definições de colonização/infecção por *P. aeruginosa* foram publicadas e utilizadas, tanto para propósitos clínicos quanto para pesquisa.

- (i) **Definição de Copenhagen (85):** A infecção crônica foi definida como a presença persistente da *P. aeruginosa* por pelo menos seis meses consecutivos, ou menos, quando combinado com a presença de dois ou mais resultados positivos de níveis de anticorpos precipitantes; colonização intermitente foi definida como a presença de uma cultura positiva para *P. aeruginosa* pelo menos uma vez e a presença de níveis normais de anticorpos precipitantes contra *P. aeruginosa*. Todos os pacientes foram consultados em uma base mensal regular e cada paciente teve uma média de 10 culturas de escarro realizadas por ano.
- (ii) **Definição de Ballmann *et al.* (62):** baseada na primeira detecção de *P. aeruginosa* em cultura (PA1), sendo a colonização crônica (PAc), primeira detecção de *P. aeruginosa* mucóide (PAm) e colonização crônica por *P. aeruginosa* mucóide (PAcm). Para transição para os estágios crônicos (PAc e PAcm), mais de 50% das culturas em um período de 12 meses devem ser positivas para *P. aeruginosa* e para o fenótipo relacionado (mucóide ou não-mucóide). Os pacientes foram consultados regularmente, de uma a quatro vezes no ano, sendo coletada uma amostra de escarro ou swab de orofaringe a cada visita.
- (iii) **Definição de Leeds (86):** Baseada em diferentes estágios da infecção e colonização por *P. aeruginosa*, do seguinte modo: Infecção crônica: cultura positiva para *P. aeruginosa* em mais de 50% dos meses em que amostras de material respiratório tenham sido coletadas; Infecção intermitente: cultura positiva para *P. aeruginosa* em 50% dos meses ou menos em que amostras de material respiratório tenham sido coletadas; Livre de infecção: sem crescimento de *P. aeruginosa* durante os 12 meses anteriores, com cultura positiva anterior a esse período; Nunca colonizados: *P. aeruginosa* nunca isolada em cultura de material respiratório. Recomenda-se a coleta de material respiratório (escarro ou “swab de tosse”) pelo menos a cada 3 meses, sendo o número médio de amostras coletadas entre 7 e 10 por ano.

*A sorologia como recurso diagnóstico para monitoramento da colonização e infecção por *P. aeruginosa**

1. Valor diagnóstico e prognóstico

Os estudos pioneiros sobre o diagnóstico sorológico da infecção por *P. aeruginosa* datam da década de 70, por Høiby *et al* (85), baseado na detecção de anticorpos precipitantes por contraímunoeletroforese (CIE). Em um seguimento de 133 pacientes por cinco anos, altos níveis de precipitinas e o rápido aumento das mesmas estiveram associadas com pior prognóstico, o que foi corroborado por Döring *et al.* (87), que encontraram uma maior produção de precipitinas quando da persistência de *P. aeruginosa* mucóide nos pulmões, levando a uma maior formação de imunocomplexos. Na década de 80, a técnica de ELISA foi incluída, avaliando a resposta a uma grande diversidade de antígenos (**Tabela 2**). Em geral, houve uma correlação significativa entre resultados de ELISA e CIE (87-89).

Brett *et al.* (90) observaram níveis mais altos de anticorpos, tanto em pacientes infectados crônicos quanto em pacientes com colonização intermitente por *P. aeruginosa*, com um *overlap* entre os dois grupos. Entretanto, altos níveis contra ExoA, ELA e PA (em relação à fosfolipase C) foram observados entre pacientes colonizados/infectados por *P. aeruginosa* mucóide do que entre os que apresentaram apenas *P. aeruginosa* não mucóide. Burns *et al.* (91) pesquisaram anticorpos IgG contra *P. aeruginosa* por meio de ELISA para ExoA e *Western blot* para antígenos da bactéria íntegra. Pela cultura de material respiratório, apenas 45% dos pacientes seriam considerados infectados, enquanto a pesquisa de anticorpos elevou essa porcentagem para 97,5%. Da Silva Filho *et al.* (92) analisaram a utilidade da sorologia (kit E15 – Mediagnost®) para 87 pacientes, comparando com a reação em cadeia de polimerase (PCR) e cultura microbiológica, incluindo 16 pacientes com cultura negativa, 20 pacientes com colonização intermitente e 51 pacientes com infecção crônica. Encontraram que a associação dos três métodos garantiu a maior porcentagem de positividade, porém sem significância estatística. Weisner *et al.* (93) estudaram a utilidade da técnica de ELISA para anticorpos anti-LPS de banda A de *P. aeruginosa* em fluidos orais comparado com amostras de soro em pacientes com cultura

positiva para *P. aeruginosa* e voluntários saudáveis. Encontraram níveis significativamente aumentados nos fluidos orais em 15 de 17 pacientes com FC e em todas as amostras de soro, e em nenhum dos voluntários. Doğru *et al.* (94) mostraram níveis significativamente altos de anticorpos contra ExoA, ELA e PA em pacientes colonizados por *P. aeruginosa* mucóide. A presença de anticorpos mostrou valores variados, com anticorpos contra ELA apresentando os maiores níveis.

Tabela 2: Estudos avaliando a utilidade diagnóstica da sorologia para pesquisa de anticorpos contra vários antígenos de *P. aeruginosa* em pacientes com FC. Casuísticas, faixas etárias e métodos utilizados nos estudos (Adaptado de Mauch e Levy, 2014 – referência 109).

Study	n	Age range (years)	Method	Antigen
Hoiby et al. [12]	133	NE ¹	CIE	St-Ag:1-17 ³
Doring et al. [13]	10	8,0 – 29,0	^a CIE and ^b RIA	^a St-Ag:1-17 ² , ^b AP and ELA
Brett et al. [14]	75	1,0 – 25,0	ELISA	Cell wall antigens
Hollsing et al. [15]	62	0,32 – 32,0	ELISA	ExoA, AP, ELA and phospholipase C
Pedersen et al. [16]	243	NE ¹	ELISA and CIE	St-Ag:1-17 ²
Brett et al. [17]	33	0,8 – 27,0	ELISA	Cell wall antigens
Formsgaard et al. [18]	10	NE ¹	^a ELISA, ^b CIE and ^c Western blot	^a LPS, ^b St-Ag:1-17 ² and ^c LPS
Kronborg et al. [19]	12	1,0 – 15,0	ELISA	Different LPS types
Burns et al. [20]	42	2,5 – 15,5	ELISA	ExoA in house
Moss et al. [21]	33	NE ¹	Western blot	TTSS proteins
West et al. [22]	68	NE ¹	ELISA	Cell lysate, ELA and ExoA
Johansen et al. [23]	157	NE ¹	CIE	St-Ag:1-17 ²
Corech et al. [24]	48	NE ¹	ELISA and Western blot	ExoA, cell lysate and TTSS proteins
Kappler et al. [25]	183	2,0 – 38,0	ELISA	ExoA, ELA and AP ³
Tramper-Standers et al. [26]	220	0,0 – 65,0	ELISA	ExoA, ELA and AP ³
Pressler et al. [27]	89	NE ¹	ELISA	St-Ag:1-17
Weisner et al. [28]	17	NE ¹	ELISA and Western blot	LPS
Ratjen et al. [29]	375	1,0 – 52,0	ELISA	ExoA, ELA and AP ³
Da Silva Filho et al. [30]	87	0,24 – 19,0	ELISA	ExoA, ELA and AP ³
Milagres et al. [31]	51	1,1 – 16,8	ELISA	Cell lysate and recombinant PcrV
Pressler et al. [32]	719	NE ¹	^a ELISA and ^b CIE	^a ExoA and ^{a,b} St-Ag:1-17 ²
Hayes et al. [33]	69	NE ¹	ELISA	Cell lysate, ExoA and ELA
Douglas et al. [34]	131	0,1 – 7,1	ELISA	St-Ag:1-17 ² and ExoA in house
Anstead et al. [35]	303	1,0 – 12,0	ELISA	ExoA, ELA, AP ³ and MCW antigens ⁴
Cruz et al. [36]	27	2,5-16,8	Western blot	TTSS proteins
Doğru et al. [37]	90	0,64 – 26,3	ELISA	ExoA, ELA and AP ³

¹ Não especificado

² Antígeno comercializado pelo Statens Serum Institute® (Copenhague, Dinamarca)

³ ExoA, PA e ELA (kit M-15) – antígenos comercializados pela Mediagnost® (Reutlingen, Alemanha)

⁴ Antígenos produzidos pelo Medical College of Wisconsin (MCW): ExoS+PopB, lisado celular PAO1 e ExoA

2. Detecção precoce da infecção por *P. aeruginosa*

Brett *et al.* (95), em outro estudo de ELISA (para anticorpos contra antígenos da parede celular), observaram um aumento nos níveis de IgG até 24,5 meses antes do primeiro isolamento de *P. aeruginosa* em cultura. Kronborg *et al.* (96) mostraram um aumento na resposta sérica de IgG, IgM e IgA ao lipídeo A, R-LPS e S-LPS durante o curso da infecção crônica, principalmente IgG e IgA. Moss *et al.* (97) encontraram a presença de anticorpos contra as proteínas do SSTT em adultos com FC por meio de *Western blot*. Cerca de 70% dos pacientes tinham níveis aumentados de IgG anti-PopD, 90% IgG anti-PopB e 67% IgG anti-PcrV. A resposta imune humoral também mostrou níveis de IgG anti-ExoS aumentados em cerca de 33% dos casos, e IgG anti-ExoA em 73% dos pacientes. Houve evidências de que a resposta humoral foi precoce aos componentes do SSTT, durante a fase inicial de infecção, como mostrado também por outros três estudos (98-100), sendo a resposta ao SSTT mais precoce do que para ExoA e lisado celular, e o patógeno sendo encontrado em um tempo médio de 21 meses antes do primeiro isolamento em cultura microbiológica.

West *et al.* (101) relataram um monitoramento longitudinal de 15 anos da resposta de anticorpos (IgG, IgM e IgA) contra vários antígenos de *P. aeruginosa* no soro de 68 pacientes, detectando a bactéria até 12 meses antes do primeiro isolamento. Níveis significativos de anticorpos contra lisado celular e ExoA foram detectados antes ou simultaneamente ao primeiro isolado de *P. aeruginosa* em cerca de 60% dos pacientes, e anticorpos contra ELA foram detectados até 40 meses após o primeiro isolamento.

Pressler *et al.* (61) seguiram 89 pacientes livres de infecção em um período de 10 anos e encontraram 28 pacientes que adquiriram a infecção crônica por *P. aeruginosa* apesar do tratamento precoce com antibióticos. Esse grupo foi comparado a um grupo controle de 28 pacientes que não adquiriram a infecção crônica e foi observado que níveis de anticorpos IgG específicos contra *P. aeruginosa* estavam significativamente maiores nos casos do que no grupo controle até 3 anos antes da aquisição da infecção crônica, mas permaneceram nos níveis iniciais no grupo controle. Mais tarde, Pressler *et al.* (102), seguindo 791 pacientes, encontraram que, de 381 pacientes com cultura negativa para *P. aeruginosa*, 11 mudaram o perfil para infectados crônicos e 24 de 129 pacientes com

colonização intermitente se tornaram infectados crônicos. Os níveis de anticorpos no último grupo foram significativamente maiores no início do estudo e aumentaram durante o curso do estudo. Níveis elevados de anticorpos anti-*Pseudomonas* específicos mostraram ser o principal fator de risco para o desenvolvimento da infecção crônica.

Tramper-Standers *et al.* (103), em estudo longitudinal, utilizando a cultura microbiológica como referência, monitoraram a resposta de IgG à ExoA, ELA e PA de 220 pacientes durante três anos consecutivos, realizando testes sorológicos anualmente. Todos os testes sorológicos, individualmente, discriminaram bem entre a ausência e presença de colonização crônica por *P. aeruginosa*.

Em 2010, Hayes *et al.* (104) publicaram um estudo longitudinal de seis anos que seguiu 69 crianças a partir do diagnóstico da FC por triagem neonatal. Utilizaram a sorologia para anticorpos anti-lisado celular, ExoA e ELA. Estabelecendo pontos de corte para o teste de acordo com a idade dos pacientes, puderam identificar precocemente a infecção por *P. aeruginosa* até dois anos antes da detecção em cultura microbiológica.

Anstead *et al.* (105), utilizando cinco tipos de antígenos e dois diferentes testes de ELISA, encontraram, em pacientes recentemente colonizados por *P. aeruginosa*, que a sorologia positiva no início do estudo não esteve significativamente associada com falha na erradicação bacteriana com tratamento prévio por 10 semanas, mas as soropositividades à PA e ExoA estiveram significativamente associadas com risco aumentado de isolamento recorrente 60 semanas após a erradicação do patógeno. Não houve associação entre a sorologia no início e o tempo para exacerbação pulmonar.

3. Resultados de sorologia e estado clínico

A correlação entre níveis de anticorpos e estado clínico foi demonstrada por Høiby *et al.* (85), que encontraram pior função ventilatória, graves alterações radiológicas e pior prognóstico associados com altos níveis de precipitinas contra *P. aeruginosa*. Brett *et al.* (95) observaram correlação entre piores escores de Shwachman-Kulczyky e Chrispin-Norman e aumento nos níveis de anticorpos IgG contra *P. aeruginosa* em pacientes infectados crônicos e com colonização intermitente. West *et al.* (101) realizaram

radiografias de tórax a cada seis meses em crianças menores de três anos e anualmente para crianças acima de quatro anos de idade. As evidências de lesões pulmonares irreversíveis ocorreram até 5,8 meses antes da primeira cultura positiva para *P. aeruginosa*, período similar ao aparecimento de anticorpos anti-ExoA.

4. Resposta de anticorpos frente ao tratamento da infecção

Brett *et al.* (90) observaram uma variação considerável nos níveis de IgG entre pacientes com FC, os quais decresceram após terapia intravenosa com antibióticos. Em outro estudo (95), houve um decréscimo significativo em pacientes para os quais a terapia com antibióticos foi bem sucedida. De 15 pacientes submetidos à terapia intravenosa, em cinco foi observada erradicação bacteriana e retorno dos níveis de anticorpos aos valores normais, enquanto que em dez, isolamentos contínuos ocorreram, além de decréscimo parcial dos níveis. Johansen *et al.* (106) encontraram um decréscimo nos níveis de precipitinas durante período de regimes de terapia antimicrobiana mais intensos, e sobrevivência consideravelmente aumentada (após aquisição da infecção crônica). Ratjen *et al.* (107), com uma avaliação longitudinal de níveis de anticorpos, antes e após antibioticoterapia inalatória em pacientes com o primeiro isolamento de *P. aeruginosa* em cultura, mostraram uma redução significativa dos níveis de anticorpos em pacientes que erradicaram a infecção, enquanto houve aumento nos níveis em pacientes nos quais a terapia de erradicação falhou. Apenas um estudo (108) não observou decréscimo significativo nos níveis de anticorpos contra os antígenos avaliados após antibioticoterapia.

5. Acurácia

Oito estudos avaliaram a acurácia da sorologia (ELISA) para diferentes antígenos em relação a diferentes padrões utilizados (**Tabela 3**) (109). Pedersen *et al.* (110), avaliando 243 pacientes, encontraram uma sensibilidade de 93% e especificidade de 92% para a técnica de ELISA quando comparada à CIE, obtendo boa correlação entre os

resultados de ambos os métodos. Em estágios avançados da infecção, a sensibilidade foi de 90% e a especificidade de 100%. Kappler *et al.* (111) em estudo prospectivo com 183 pacientes com cultura negativa, colonização intermitente e infectados crônicos por *P. aeruginosa*, relataram que a sorologia para três antígenos (ExoA, ELA e PA) resultou em uma sensibilidade de 86%, especificidade de 96% e valor preditivo positivo (VPP) de 97%, em relação à cultura microbiológica de material respiratório. Tramper-Standers *et al.* (103) estudaram 67 pacientes infectados crônicos, 60 com colonização intermitente e 93 sem colonização por *P. aeruginosa*. Os testes de ELISA (ExoA, ELA e PA), utilizando os valores de corte aconselhados pelo fabricante, tiveram uma sensibilidade de 79% e especificidade de 89% para colonização crônica. Aplicando curvas ROC para otimização dos valores de corte, obtiveram uma sensibilidade de 96% e especificidade de 97% (quando as respostas a todos os antígenos foram avaliadas juntas).

Ratjen *et al.* (106), estudando a resposta contra ExoA, ELA e PA em 375 pacientes (e uma coorte de 56 pacientes sob terapia com antimicrobianos), observaram variabilidade individual nos níveis de anticorpos contra ExoA, ELA e PA, com boa sensibilidade e especificidade para os 3 antígenos.

Pressler *et al.* (102), pela primeira vez, avaliaram os três métodos sorológicos mais utilizados na rotina de seguimento da FC e sua utilidade na detecção precoce da *P. aeruginosa*. Estudaram 381 pacientes livres de infecção, 129 com colonização intermitente e 281 infectados crônicos. Os valores encontrados mostraram alta sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) (cerca de 90%) para todos os métodos.

Douglas *et al.* (110) compararam dois métodos sorológicos (ELISA para anticorpos contra o St-Ag:1-17, do grupo de Copenhagen, e ELISA anti-ExoA *in house*) entre duas populações de pacientes com FC na Austrália. Observaram altos VPPs, mas baixos VPNs em ambas as populações para os dois métodos, em relação à cultura de LBA (utilizado como padrão-ouro no estudo) – respectivamente, 14 e 26% para o St-Ag:1-17 e 11% e 19% para a ExoA. Porém, reconhecem no estudo as limitações do LBA, como amostragem regional e probabilidade de ocorrência de resultados falsos-negativos.

Anstead *et al.* (105) acurácias variadas empregando cinco diferentes métodos sorológicos em um estudo multicêntrico, obtendo bons resultados de especificidade e VPN,

apesar de VPP e sensibilidade oscilantes, diferente de Doğru *et al.* (94), que encontraram alto VPP, VPN e sensibilidade para detecção de anticorpos anti-ExoA, ELA e PA, porém alto número de pacientes com cultura negativa apresentaram níveis altos de anticorpos, resultando em baixa especificidade.

Tabela 3: Estudos avaliando a acurácia da sorologia para detecção de anticorpos contra diferentes antígenos de *P. aeruginosa* por meio da técnica de ELISA (Adaptado de Mauch e Levy, 2014 – referência 109).

Study	Antigen	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
Pedersen et al. [16]	St-Ag:1-17	93.0%	92.0%	93.0%	72.0%
Kappler et al. [25]	Combination of				
	ExoA, AP and ELA	86.1%	95.6%	97.1%	80.6%
Tramper-Standers et al. [26]	AP	76.0%	97.0%	NI	NI
	ELA	87.0%	89.0%	NI	NI
	ExoA	79.0%	81.0%	NI	NI
Ratjen et al. [29]	AP	85.4%	97.5%	96.6%	88.8%
	ELA	76.2%	97.5%	96.2%	83.2%
	ExoA	72.0%	97.5%	95.9%	80.8%
Pressler et al. [32]	ExoA	89.0%	93.0%	86.0%	95.0%
	St-Ag:1-17	83.0%	97.0%	80.0%	98.0%
Douglas et al. [34]	St-Ag:1-17	91% ^a and 53% ^b	64% ^a and 82% ^b	14% ^a and 26% ^b	99% ^a and 94% ^b
	ExoA in house	82% ^a and 93% ^b	57% ^a and 52% ^b	11% ^a and 19% ^b	98.0% ^{a,b}
Anstead et al. [35]	AP	45.0%	81.0%	85.0%	74.0%
	ELA	52.0%	78.0%	38.0%	86.0%
	ExoA	67.0%	58.0%	29.0%	87.0%
	PopB + ExoS	48.0%	83.0%	42.0%	86.0%
	PAO1	60.0%	72.0%	35.0%	88.0%
Doğru et al. [37]	AP	84.0%	40.0%	100.0%	77.8%
	ELA	80.0%	44.4%	100.0%	80.0%
	ExoA	80.0%	43.3%	100.0%	78.4%

NI: não informado; ^a Pacientes submetidos ao lavado broncoalveolar; ^b Pacientes do Australasian Bronchoalveolar Lavage Trial

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Padronizar a técnica de ELISA para diagnóstico sorológico da infecção pulmonar por *P. aeruginosa* em pacientes com FC atendidos no Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (HC-Unicamp).

3.2. Objetivos Específicos

- Comparar os níveis de anticorpos medidos pela sorologia e achados de cultura microbiológica de material respiratório para avaliar a utilidade do primeiro no seguimento dos pacientes;
- Avaliar o valor diagnóstico do teste sorológico ELISA em relação à cultura microbiológica, verificando sua acurácia e valores preditivos;
- Iniciar o monitoramento sorológico de pacientes com FC e cultura negativa ou colonização intermitente por *P. aeruginosa*.

4. JUSTIFICATIVA

A sorologia para pesquisa de anticorpos contra *P. aeruginosa* tem surgido como uma possível técnica auxiliar na detecção precoce da bactéria e para determinar a terapia antimicrobiana precoce para sua erradicação. Métodos altamente sensíveis para a detecção de anticorpos contra vários antígenos de *P. aeruginosa* podem complementar os métodos de monitoramento atualmente utilizados. Níveis positivos de anticorpos e amostras negativas de secreção do trato respiratório devem alertar os profissionais de saúde para uma pesquisa mais aprofundada de uma possível infecção, repetindo o teste ou utilizando testes mais sensíveis e específicos. Em contraste, níveis de anticorpos aumentados estão associados com uma maior probabilidade de infecção crônica por *P. aeruginosa*. Níveis de anticorpos elevados no momento da cultura microbiológica inicial podem constituir uma ferramenta útil para clínicos e pesquisadores da área no monitoramento de pacientes com risco de infecção subsequente.

5. CASUÍSTICA

O presente estudo foi realizado no ambulatório de FC do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (HC-Unicamp). Foram incluídos pacientes seguidos no ambulatório, com diagnóstico confirmado de FC por testes apropriados, como triagem neonatal (dosagem de tripsina imunorreativa), dosagem de íons sódio e cloreto no suor e confirmação genética (111-113). A todos os pacientes (ou responsáveis legais, quando o caso) foi apresentado um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE – em anexo) explicando os procedimentos da pesquisa, o qual foi assinado por todos que concordaram em participar da mesma. Para fins de comparação entre níveis de anticorpos, foram selecionados indivíduos presumidamente saudáveis para composição de um grupo controle negativo, os quais estavam enquadrados nos seguintes critérios:

- Faixa etária de 0 a 30 anos
- Exclusão do diagnóstico de Fibrose Cística
- Ausência de:
 - histórico recente de infecção pulmonar de qualquer etiologia
 - antecedentes de infecção pulmonar crônica de qualquer etiologia
 - patologia causadora de comprometimento da função pulmonar (ex: asma, DPOC, enfisema pulmonar, tabagismo crônico, etc.)
 - histórico de qualquer tipo de imunodeficiência e uso de medicações que pudessem comprometer a imunidade.
 - qualquer doença crônica
 - qualquer antecedente de infecção por *P. aeruginosa*

A todos esses indivíduos (ou responsáveis legais, quando o caso) também foi apresentado um TCLE (em anexo), sendo este assinado por todos os que concordaram em participar da pesquisa.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Obtenção e cultura microbiológica de material respiratório

A secreção das vias aeríferas inferiores foi obtida por meio de expectoração em recipiente universal estéril. Em caso de pacientes incapazes de expectorar, a secreção das vias aeríferas superiores foi obtida por meio de swab de orofaringe do pescudo da secreção produzida após indução da tosse. Esses materiais foram encaminhados ao Laboratório de Microbiologia do HC-Unicamp, no qual foram submetidos à cultura e identificação microbiológica, de acordo com metodologia previamente descrita (3).

6.2. Sorologia para detecção de anticorpos contra *P. aeruginosa*

6.2.1. Coleta de amostras

Para realização da sorologia, foram coletadas, dos pacientes e indivíduos do grupo controle negativo, amostras de sangue em tubo seco, as quais foram submetidas à centrifugação a 4000 rpm e, posteriormente, foram separados os soros. A quantidade de sangue coletada foi determinada levando-se em conta a idade do paciente. Para pacientes menores de dois anos de idade, foram coletados 2,0 mL e, para pacientes maiores de dois anos de idade, foram coletados 4,0 mL. Os níveis de anticorpos séricos contra *P. aeruginosa* foram medidos por meio do teste de ELISA indireto.

6.2.2. Descrição do teste ELISA indireto

O teste de ELISA é bastante utilizado como ferramenta diagnóstica na área da saúde e como ferramenta analítica em pesquisas para a detecção e quantificação de antígenos ou anticorpos específicos em uma determinada amostra (114). O teste utiliza o conceito imunológico básico de um antígeno se ligando a seu anticorpo específico, o que permite a detecção de quantidades muito pequenas de antígenos, tais como proteínas, peptídeos, hormônios, ou anticorpos em uma amostra de fluido. Utiliza-se antígenos e anticorpos

marcados com enzima para detectar moléculas biológicas. Basicamente, o teste de ELISA ocorre do seguinte modo: o antígeno em fase líquida é imobilizado em microplacas de 96 poços, sendo ligado a um anticorpo específico, o qual é subsequentemente detectado por um anticorpo secundário conjugado com enzima. Um substrato cromogênico para a enzima proporciona uma mudança de cor da reação, indicando a presença do antígeno (**Figura 5**). Medidas quantitativas ou qualitativas podem ser determinadas baseando-se na leitura colorimétrica em espectrofotômetro leitor de ELISA (114).

No ELISA indireto, uma amostra que deve ser analisada para um antígeno específico é aderida aos poços da microplaca, seguido da adição de uma solução de proteína não reagente, tal como a albumina bovina sérica, para bloqueio de qualquer área dos poços não revestida com o antígeno. O anticorpo sérico primário, que se liga especificamente ao antígeno, é então adicionado, seguido pelo anticorpo secundário conjugado à enzima. Um substrato para a enzima é introduzido para a quantificação do anticorpo primário, por meio de mudança da coloração na reação (114). A absorbância da reação é lida em espectrofotômetro leitor de ELISA e os resultados de absorbância são convertidos na unidade de medida de concentração dos anticorpos específicos, aplicando-se tais resultados à equação de uma curva padrão de calibração, construída por meio da leitura das absorbâncias de diferentes concentrações de um soro padrão, em função da unidade de medida de concentração adotada (115,116).

Todos os reagentes no teste de ELISA devem apresentar concentrações ótimas, para maior confiabilidade do teste. Para a determinação das concentrações ótimas do antígeno, do conjugado e do soro a serem utilizadas, todos os reagentes no teste de ELISA devem ser adicionados em excesso, exceto aquele sendo testado (115,116).

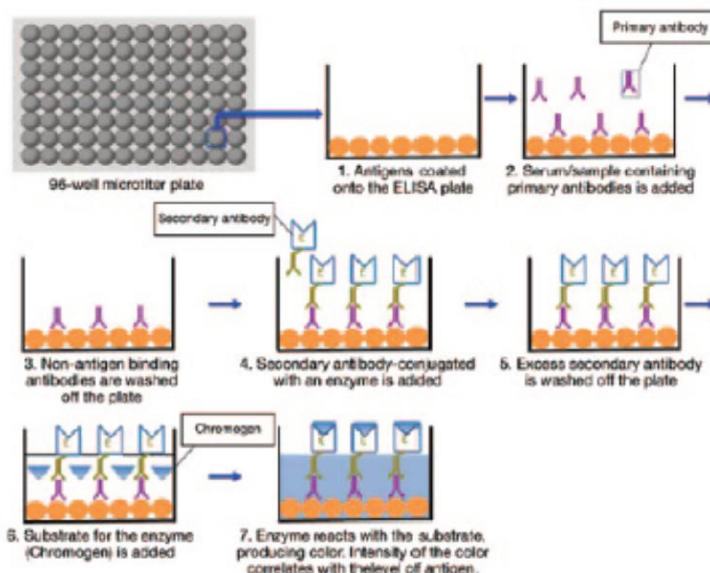


Figura 5: Técnica de ELISA para detecção de anticorpos em amostras biológicas. O antígeno (em fase líquida) é adicionado aos poços da microplaca, aderindo-se aos mesmos. O anticorpo primário liga-se especificamente ao antígeno. Um anticorpo secundário, ligado à enzima, é adicionado e reage com um cromógeno, produzindo uma mudança de cor para detectar qualitativamente ou quantitativamente os anticorpos contra o antígeno. (Extraído de Gan e Patel, 2013 – referência 114).

6.2.3. Padronização do teste ELISA indireto

Para a padronização da técnica, foram utilizados os seguintes materiais e reagentes:

- Microplaca de ELISA Maxisorp de 96 poços (Thermo Fisher®, Waltham, MA, Estados Unidos);
- Pool de antígenos – 64 antígenos de 17 sorotipos de *P. aeruginosa* (**St-Ag:1-17**) (Statens Seruminstitut®, Copenhagen, Dinamarca);
- Antissoro padrão humano para construção de curva de calibração (Statens Seruminstitut®, Copenhagen, Dinamarca);
- Conjugado – Anticorpo secundário marcado com enzima peroxidase (Dako®, Glostrup, Dinamarca);
- Tampão de lavagem e diluição (amostras de soro, antissoro padrão humano e conjugado) *in house* – Solução salina-fosfato (137 mmol/L NaCl + 2,7

mmol/L KCl + 10 mmol/L Na₂HPO₄ + 1,8 mmol/L KH₂PO₄) acrescida de Tween 20 (Sigma-Aldrich®) a 0,1% – SST-Tween, pH 7,4;

- Tampão de diluição de antígeno *in house* – Solução-tampão carbonato-bicarbonato (10 mmol/L Na₂CO₃ + 28 mmol/L NaHCO₃), pH 9,5;
- Tampão de diluição de substrato *in house* – Solução-tampão acetato de sódio-ácido acético (9,9 mmol/L CH₃COONa + 6,3 mmol/L CH₃COOH), pH 5,5;
- Substrato – Tetrametilbenzidina (TMB) em tabletes (Sigma-Aldrich®) + Peróxido de hidrogênio (1,42 mol/L H₂O₂);
- Ácido sulfúrico *in house* (H₂SO₄ 2,0 N) para parada de reação;
- Espectrofotômetro leitor de ELISA Multiskan (Labsystem®, Helsinque, Finlândia).

Para a otimização das concentrações dos reagentes a serem utilizados, foram feitos ensaios empregando-se as concentrações dos reagentes indicadas pelo fabricante do antígeno e do antissoro padrão, exceto para o reagente sendo testado, do qual foram feitas diluições seriadas. As atividades enzimáticas das reações a 630 nm foram testadas em espectrofotômetro leitor de ELISA Multiskan (Labsystems®, Helsinque, Finlândia) e a diluição escolhida foi aquela que apresentou maior atividade enzimática quando da linearidade da taxa de conversão do substrato.

Primeiramente, foi feita a padronização da concentração do antígeno, realizando-se o seguinte procedimento: a partir de uma solução-estoque do antígeno St-Ag:1-17 de 9.10³ µg/mL, foram feitas diluições seriadas (1/250, 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/16000, 1/32000, 1/64000 e 1/128000 v/v) em tampão carbonato-bicarbonato. As reações para cada diluição foram realizadas em triplicata.

Para a padronização da concentração do conjugado, a partir de uma solução-estoque, diluições seriadas (nas mesmas proporções adotadas na padronização da concentração do antígeno) foram realizadas em SST-Tween. As reações para cada diluição foram realizadas em triplicata.

Finalmente, foi feita a padronização da concentração do soro. A partir de uma solução com concentração 1/200 v/v (5 µL soro / 1000 µL SST-Tween), foram feitas diluições seriadas em SST-Tween (1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200). Para a otimização dessa concentração, foram testados os soros de 31 pacientes com FC e infecção pulmonar crônica por *P. aeruginosa* e os de 53 sujeitos presumidamente saudáveis. Pontos de corte para a reação de ELISA foram definidos para cada diluição do soro, por meio de curva ROC, sendo os resultados acima desse ponto considerados positivos. As reações para cada diluição foram realizadas em triplicata e as absorbâncias lidas em espectrofotômetro leitor de ELISA Multiskan (Labsystems®, Helsinque, Finlândia) em comprimento de onda de 450 nm. Os resultados finais de absorbância foram aplicados à equação da curva de calibração da reação correspondente (exemplo: **Figura 6**) e convertidos em unidades arbitrárias por mililitro (U/mL). Foram calculadas a sensibilidade e a especificidade para cada uma das diluições de soro e a concentração ótima foi determinada como aquela que apresentou a melhor razão entre os melhores valores de sensibilidade e especificidade e, portanto, maior diferenciação entre sorologia positiva e negativa.

Determinadas as concentrações ótimas do antígeno, conjugado e soro, a técnica foi realizada seguindo-se o protocolo abaixo:

- a) Sensibilização prévia de microplaca durante 1h30min com o antígeno padrão St-Ag:1-17 diluído em tampão carbonato-bicarbonato;
- b) Lavagem da placa com SST-Tween – 100 µL/poço (3 lavagens de 3 minutos cada);
- c) Adição de solução tampão de bloqueio (SST-Tween com albumina bovina 0,1%) para bloqueio dos sítios inespecíficos – 100 µL de solução por poço durante 1h;
- d) Lavagem da placa com SST-Tween – 100 µL/poço (2 lavagens de 3 minutos cada);
- e) Adição dos soros dos sujeitos avaliados e do antissoro padrão humano – 100 µL/poço durante 1h;
- f) Lavagem da placa com SST-Tween – 100 µL/poço (3 lavagens de 3 minutos cada);

- g) Adição de conjugado (soro de coelho com anticorpos anti-IgG humana) – 100 µL/poço durante 1h;
- h) Lavagem da placa com SST-Tween – 100 µL/poço (5 lavagens de 3 minutos cada);
- i) Adição de substrato – 100 µL/poço durante 10min;
- j) Adição de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2,0 N para parada de reação – 100 µL de solução por poço;
- k) Leitura da absorbância (comprimento de onda de 450 nm) em espectrofotômetro Multiskan (Labsystems[®], Helsinque, Finlândia).

As absorbâncias das amostras e do antissoro padrão humano foram aplicadas à equação da curva de calibração correspondente (absorbância em função da concentração) sendo que, para cada ensaio, foi construída uma curva de calibração. Os resultados de absorbância foram convertidos em U/mL, sendo esta a unidade de medida adotada para quantificação da concentração de anticorpos anti-*P. aeruginosa* específicos. A curva de calibração foi construída empregando-se variadas diluições do antissoro padrão humano, às quais foram atribuídos diferentes valores de concentração (0,39 a 100 U/mL), seguindo-se as recomendações do fabricante do antígeno e antissoro (**Tabela 4, Figura 6**).

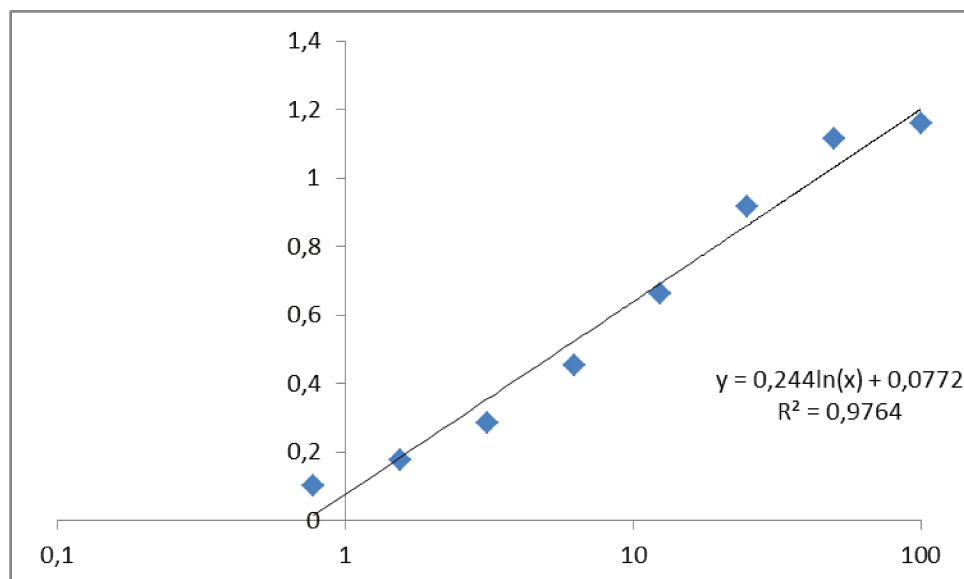


Figura 6: Exemplo de curva de calibração construída com a utilização de diferentes concentrações de antissoro padrão humano. O eixo das ordenadas corresponde aos valores de absorbância e o eixo das abcissas corresponde aos valores de concentração (U/mL).

Tabela 4: Exemplo de valores utilizados para construção de curva de calibração utilizando diferentes concentrações de um antissoro padrão humano.

Curva de calibração		
Diluição	Valor (UA/mL)	Absorbância
1/2.000	100	1,161
1/4.000	50	1,113
1/8.000	25	0,917
1/16000	12,5	0,663
1/32000	6,25	0,454
1/64000	3,12	0,286
1/128000	1,56	0,175

6.2.4. Desenho do estudo

Primeiramente foi realizado um estudo transversal, de janeiro de 2012 a outubro de 2013, visando determinar a acurácia da sorologia frente à cultura microbiológica. Neste estudo, foi analisada apenas uma amostra de soro por paciente e os resultados dos níveis de anticorpos foram comparados com os resultados de cultura microbiológica. Os pacientes

avaliados foram classificados de acordo com seu perfil de colonização/infecção por *P. aeruginosa*, segundo critérios Lee *et al.* (86); consideramos como cultura positiva para *P. aeruginosa* os pacientes infectados crônicos e com colonização intermitente e, como cultura negativa, os pacientes livres de infecção e nunca colonizados. Para fins de comparação, foi formado um grupo controle negativo, composto de sujeitos presumidamente saudáveis. Desses sujeitos, também foi coletada apenas uma amostra de sangue para posterior separação do soro para pesquisa de anticorpos séricos contra *P. aeruginosa*. A distinção do sexo, o cálculo da mediana de idade e faixa etária, o cálculo da mediana de níveis de anticorpos e do intervalo desses níveis foram realizados para cada grupo. Buscamos também avaliar se houve correlação entre níveis de anticorpos e idade dos indivíduos, tanto para pacientes com sorologia positiva quanto para o grupo controle negativo.

Paralelamente ao estudo transversal, foi realizado um estudo de acompanhamento longitudinal, até maio de 2014, visando observar a variação dos níveis de anticorpos em pacientes sem infecção crônica por *P. aeruginosa*. De cada paciente, foram coletadas de duas a quatro amostras para análise sorológica, em intervalos de tempo não homogêneos. Primeiramente, foi avaliada a diferença geral nos níveis de anticorpos, considerando todos os pacientes incluídos no estudo. Os pacientes foram, então, separados em grupos, de acordo com seu perfil de colonização/infecção por *P. aeruginosa* no início do acompanhamento e a diferença nos níveis de anticorpos entre esses grupos nos quatro diferentes períodos de coleta foi avaliada. Depois, os pacientes foram separados em dois grupos: pacientes que tiveram evolução no perfil de colonização/infecção (de nunca colonizado/livre de infecção para colonização intermitente/infecção crônica e de colonização intermitente para infecção crônica) por *P. aeruginosa* e pacientes que não tiveram essa evolução; foi avaliada a diferença nos níveis de anticorpos entre os dois grupos nos quatro diferentes períodos de coleta, bem como o risco de evolução no perfil de colonização/infecção para pacientes que apresentaram resultados positivos de sorologia na primeira coleta em relação aos pacientes que não apresentaram tais resultados. Também foi avaliada a diferença na evolução dos títulos de anticorpos entre pacientes que adquiriram posteriormente a infecção crônica por *P. aeruginosa* e aqueles que não adquiriram.

7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para comparação entre duas amostras, o teste de Mann-Whitney foi utilizado para amostras independentes e o teste de Wilcoxon foi utilizado para amostras relacionadas. Para comparações múltiplas, o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para amostras independentes e o teste de Friedman foi utilizado para amostras relacionadas. Para análises de risco, foi utilizado o cálculo do odds-ratio (OR) e para correlações, foi utilizado o teste de Spearman.

Para estabelecer o valor de corte do método, foi construída uma curva ROC (receiver operating characteristics) (117) para distinção entre resultados positivos e negativos, baseando-se nos resultados dos pacientes com FC e infecção crônica por *P. aeruginosa* e sujeitos presumidamente saudáveis (grupo controle). Um gráfico de curva ROC é uma técnica para visualização, organização e seleção de modelos de classificação em testes diagnósticos, baseados em suas performances, mostrando equilíbrios relativos entre testes verdadeiros positivos e falsos positivos, buscando uma razão ótima entre sensibilidade e especificidade (117). Uma variação de 5% foi aplicada arbitrariamente ao valor de corte para definir três áreas de resultados – positivo, negativo e uma zona cinza entre eles. Baseando-se nos valores estabelecidos, foram também calculadas as medidas de acurácia para a técnica (sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo), utilizando-se tabela de contingência padrão (**Tabela 5**).

Tabela 5: Tabela de contingência padrão para cálculo de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN.

Método padrão-ouro (doença)	Teste em estudo		
	Resultado		
	Positivo	Negativo	
Positivo	a	c	(a+c)
Negativo	b	d	(b+d)
	(a+b)	(c+d)	
Sensibilidade = $a/(a+b)$			
Especificidade = $d/(c+d)$			
VPP = $a/(a+c)$			
VPN = $d/(b+d)$			

8. RESULTADOS

8.1. Padronização do teste de ELISA

Após testar as diferentes concentrações de antígeno e diferentes diluições do conjugado, foram empregadas a concentração de 45 µg/mL para o antígeno (**Figura 7**) e a diluição de 1/4000 v/v para o conjugado (**Figura 8**). Na determinação da concentração ótima do soro, as concentrações de 1/400, 1/800 e 1/1600 v/v apresentaram os mesmos valores de sensibilidade e especificidade, sendo os mesmos maiores do que os valores apresentados empregando-se a concentração de 1/3200 v/v (**Tabela 6**). Foi escolhida para o teste a concentração de 1/800 v/v.

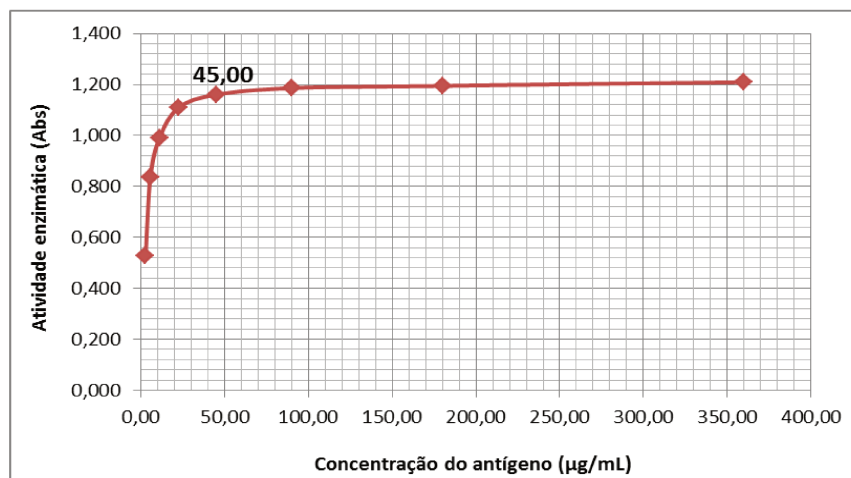


Figura 7: Determinação da concentração ótima de antígeno a ser utilizada no teste.

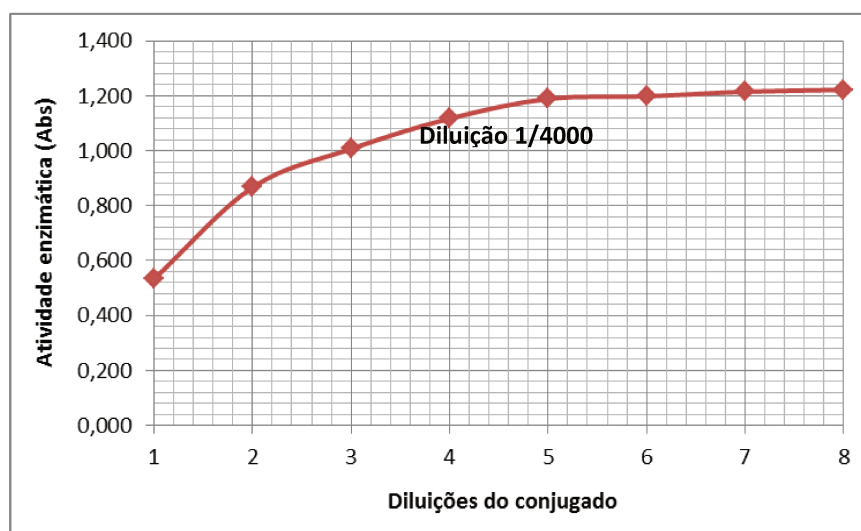


Figura 8: Determinação da diluição do conjugado a ser utilizada no teste.

Tabela 6: Determinação da concentração de soro a ser utilizada no estudo.

Diluição empregada (v/v)	Valor de corte (UA/mL)*	Relação cultura/sorologia				Acurácia	
		+/+	+/-	-/+	-/-	Sensibilidade	Especificidade
1/400	23,12	31	0	2	51	100%	96%
1/800	14,57	31	0	2	51	100%	96%
1/1600	5,65	31	0	2	51	100%	96%
1/3200	3,06	29	2	3	50	94%	94%

*Determinado por meio de curva ROC, com os resultados dos sujeitos presumidamente saudáveis e pacientes com FC e infecção crônica por *P. aeruginosa* de acordo com a cultura microbiológica de material respiratório.

8.2. Resultados do estudo transversal

8.2.1. Pacientes e grupo controle negativo

Um total de 117 pacientes e 53 sujeitos presumidamente saudáveis tiveram uma amostra de soro coletada para análise transversal. De acordo com o perfil de colonização/infecção por *P. aeruginosa*, dos 117 pacientes, 35 foram classificados como nunca colonizados, 27 como livres de infecção, 24 como colonização intermitente e 31 como infectados crônicos. Os cálculos da mediana de idade e mediana dos níveis de anticorpos, a determinação da faixa etária e da faixa de níveis de anticorpos e a distinção por sexo foram realizados para cada grupo, bem como para o grupo controle (Tabela 7).

Tabela 7:

- a) Pacientes com FC separados por perfis de colonização/infecção por *P. aeruginosa* e grupo controle negativo - idade e sexo de todos os grupos.

Grupos de sujeitos avaliados	Número de sujeitos (%)	Sexo		Idade	
		Masculino	Feminino	Faixa etária (anos)	Mediana de idade (anos)
FC infecção crônica	31 (26)	17	14	3 - 30	14,70
FC colonização intermitente	24 (21)	16	8	1,6 - 16	9,00
FC livres de infecção	27 (23)	8	19	3 - 25	8,20
FC nunca colonizados	35 (30)	22	13	0,16 - 26	3,00
TOTAL (Pacientes com FC)	117 (100)	63	54	0,16 - 30	8,70
Grupo controle negativo	53	32	21	0,08 - 30	9,70

- b) Pacientes com FC e grupo controle negativo – Níveis de anticorpos em cada grupo

Grupos de sujeitos avaliados	Valor mínimo	Valor máximo	Níveis de anticorpos	
			Mediana dos níveis (AU/mL)	p-valor
FC infecção crônica	13,98	497,06	100,47	p < 0,001*
FC colonização intermitente ‡	1,48	65,55	8,86	
FC livres de infecção ‡	0,81	38,99	5,27	
FC nunca colonizados ‡	0,51	65,25	2,75	
Grupo controle negativo ‡	1,25	19,95	3,89	

**p*-valor obtido após a aplicação do teste de Kruskal-Wallis para comparações múltiplas – comparação entre todos os grupos de modo geral.

‡ Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados os valores entre os seguintes grupos: FC livres de infecção e FC colonização intermitente, FC livres de infecção e grupo controle negativo, FC nunca colonizados e grupo controle negativo.

8.2.2. Níveis de anticorpos anti-*Pseudomonas*

Baseado nos valores do grupo controle negativo e dos pacientes com FC infectados crônicos, o valor de corte (cut-off) primário estabelecido para o teste foi de 14,57 U/mL, de acordo com os valores encontrados em curva ROC (**Figura 9**). Aplicando uma variação arbitrária de 5% a esse valor, os resultados positivos, zona cinza e negativos foram definidos como, respectivamente < 13,8 U/mL, 13,8 a 15,3 U/mL e > 15,3 U/mL.

Aplicando-se o teste de Kruskal-Wallis para comparações múltiplas, levando em conta os resultados de todos os grupos de pacientes em geral, encontramos que os valores não foram estatisticamente iguais em todos os grupos ($p < 0,001$). Não foi observada diferença estatística quando comparados os valores dos seguintes grupos: pacientes livres de infecção e pacientes com colonização intermitente ($p = 0,064$), pacientes livres de infecção e grupo controle negativo ($p = 0,232$) e pacientes com FC nunca colonizados e grupo controle negativo ($p = 0,062$) (**Tabela 7; Figura 10**). A variação dos níveis foi significativamente maior nos pacientes infectados crônicos em relação aos outros grupos avaliados ($p < 0,001$). Quando avaliados apenas os pacientes considerados como cultura positiva para *P. aeruginosa*, os níveis diferiram significativamente ($p < 0,001$) entre os pacientes com presença de *P. aeruginosa* mucóide e pacientes sem a presença de *P. aeruginosa* mucóide em cultura microbiológica (**Tabela 8**).

Também foi encontrada, por meio do teste de Spearman, uma correlação positiva entre níveis de anticorpos e idade nos pacientes com sorologia positiva ($r = 0,40$; $p < 0,01$) e nos controles sadios ($r = 0,37$; $p < 0,05$).

Tabela 8: Níveis de anticorpos de acordo com a presença ou ausência *P. aeruginosa* mucóide em cultura microbiológica

	N	Mediana (UA/mL)	Faixa	p-valor
Pacientes sem <i>P. aeruginosa</i> mucóide em cultura	15	6,18	1,48 – 62,55	< 0,001
Pacientes com <i>P. aeruginosa</i> mucóide em cultura	40	85,74	1,92 – 497,06	

8.2.3. Medidas de acurácia

Para esse cálculo, os pacientes com FC e infecção crônica por *P. aeruginosa* foram considerados como tendo presença da doença e os sujeitos do grupo controle negativo foram considerados como tendo ausência da doença. Entre os pacientes com FC infectados cronicamente por *P. aeruginosa*, 30 de 31 pacientes apresentaram níveis de anticorpos acima do valor de corte estabelecido e, logo, sorologia positiva, caracterizando uma sensibilidade de 96,8% (**Tabela 9**). No grupo controle, 52 de 53 sujeitos avaliados apresentaram níveis abaixo do valor de corte e, logo, sorologia negativa, caracterizando uma especificidade de 98,1%. Entre os indivíduos com sorologia positiva (n = 31), o número de positivos verdadeiros foi de 30, caracterizando um VPP de 96,8%. Entre os indivíduos com sorologia negativa (n = 53), encontramos 52 negativos verdadeiros, caracterizando um VPN de 98,1%.

Entre os pacientes com FC e colonização intermitente por *P. aeruginosa*, oito entre 24 pacientes (33,3%) apresentaram sorologia positiva. Também encontramos quatro pacientes com cultura negativa para *P. aeruginosa* apresentando sorologia positiva, sendo três pacientes do grupo dos livres de infecção (11,1% do total do grupo) – 89% com sorologia negativa – e um paciente no grupo dos nunca colonizados (2,9% do total do grupo) – 97,1% com sorologia negativa (**Tabela 9**).

Tabela 9:

a) Medidas de acurácia do teste.

Grupo de sujeitos	N	Sorologia positiva	Sorologia negativa	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
FC infecção crônica	31	30	1	96,8%	98,1%	96,8%	98,1%
Controle negativo	53	2	51				

b) Porcentagem de indivíduos com sorologia positiva e sorologia negativa nos grupos de pacientes com FC e colonização intermitente, livres de infecção e nunca colonizados.

Grupo de sujeitos	N Total	Sorologia positiva (%)	Sorologia negativa (%)
FC colonização intermitente	24	8 (33,3%)	16 (66,7%)
FC livres de infecção	27	3 (11,1%)	24 (89,9%)
FC nunca colonizados	35	1 (2,9%)	34 (97,1%)

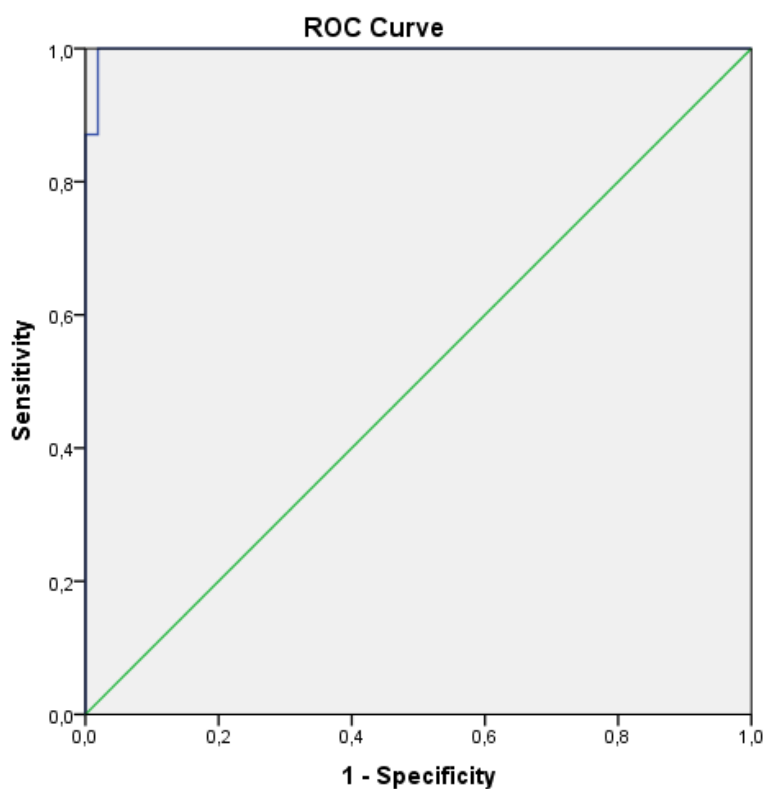


Figura 9: Curva ROC para determinação do ponto de corte para o método. A razão ótima entre sensibilidade e (1 – especificidade) (1,000 e 0,019) foi encontrada para o valor de 14,57 UA/mL. À esse valor foi aplicado uma variação arbitrária de 5% para a determinação dos valores limites para positividade, zona cinza e negatividade do teste.

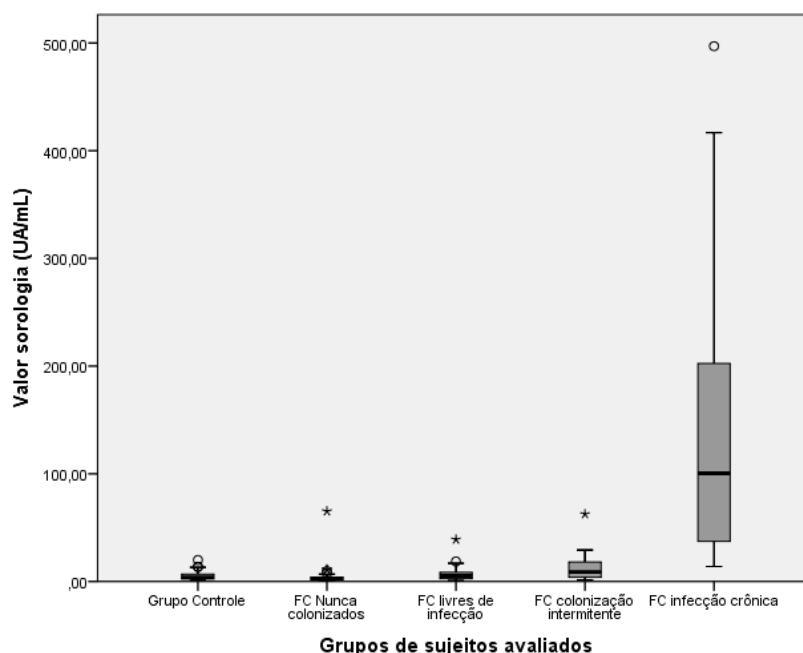


Figura 10: Diferenças na distribuição dos níveis de anticorpos entre os grupos de sujeitos avaliados no estudo (Pacientes com FC e grupo controle).

8.3. Resultados do estudo longitudinal

8.3.1. Diferença geral dos níveis de anticorpos em quatro períodos de coleta

Nessa análise, foram incluídos 78 pacientes, sendo 34 do sexo feminino e 44 do sexo masculino, com mediana de idade de 7,52 anos. Foi observado um aumento progressivo na mediana dos níveis de anticorpos (**Tabela 10; Figura 11**), com diferença estatisticamente significativa, mostrada pelo teste de Friedman, quando levados em contas todos os períodos de coleta de amostras ($p < 0,0001$). Porém, o teste de Wilcoxon mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre o terceiro e o quarto período de coleta de amostras ($p = 0,131$).

Tabela 10: Diferença nos níveis de anticorpos em quatro diferentes períodos de coleta de amostras, considerando todos os pacientes incluídos no estudo longitudinal.

N	Mediana dos níveis de anticorpos (U/mL)				<i>p</i> -valor
	Início	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta	
78	5,62	6,62	19,01	19,65	< 0,0001
<i>p</i> -valor	0,001	0,009	0,131		

8.3.2. *Diferença dos níveis de anticorpos de acordo com o perfil de colonização/infecção por P. aeruginosa no início do acompanhamento*

No início do acompanhamento longitudinal, de acordo com o perfil de colonização/infecção por *P. aeruginosa*, 18 pacientes foram classificados como tendo colonização intermitente, 24 pacientes foram classificados como livres de infecção e 36 pacientes como nunca colonizados (**Tabela 11**). Os pacientes classificados inicialmente como colonização intermitente tiveram níveis de anticorpos significativamente maiores do que os pacientes dos outros grupos no primeiro e segundo períodos de coleta, porém não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos no terceiro e quarto períodos de coleta ($p = 0,811$ e $p = 0,227$, respectivamente).

8.3.3. *Diferença nos níveis de anticorpos de acordo com a evolução ou não no perfil de colonização/infecção por P. aeruginosa*

Um total de 22 pacientes mostrou evolução no perfil de colonização/infecção por *P. aeruginosa*. Dos pacientes classificados inicialmente como nunca colonizados, cinco pacientes mudaram o perfil para colonização intermitente. Dos pacientes inicialmente classificados como livres de infecção, 11 pacientes mudaram o perfil para colonização intermitente e, desses, dois se tornaram infectados crônicos. Dos pacientes inicialmente classificados como colonização intermitente, cinco mudaram o perfil para infecção crônica. A variação dos níveis de anticorpos foi maior entre os pacientes que apresentaram evolução no perfil de colonização/infecção, e em todos os períodos de coleta a mediana dos níveis de anticorpos dos pacientes que apresentaram evolução no perfil foi maior do que nos que não apresentaram essa evolução.

Tabela 11: Diferença nos níveis de anticorpos em quatro períodos de coleta de amostras de acordo com o perfil de colonização/infecção por *P. aeruginosa* no início do estudo longitudinal.

Perfil de colonização/infecção (início do estudo)	N (início)*	Mediana dos níveis de anticorpos (U/mL)			
		Início	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta
Nunca colonizado	36	4,33	5,93	18,03	6,73
Livre de infecção	24	5,62	5,88	20,23	31,38
Colonização intermitente	18	9,80	27,94	17,13	19,65
<i>p-valor</i>		0,016	0,029	0,811	0,227

*Número de pacientes em cada grupo no início do acompanhamento. Houve mudança do perfil de colonização/infecção em parte dos pacientes de cada grupo durante o andamento do estudo.

Tabela 12: Diferença nos níveis de anticorpos de acordo com a evolução ou não do perfil de colonização/infecção por *P. aeruginosa* no decorrer do estudo longitudinal.

Evolução no perfil de colonização/infecção*	Mediana dos níveis de anticorpos (U/mL)				
	Início	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta	<i>p-valor</i>
Sim	9,16	15,03	22,08	22,28	0,007
Não	4,87	6,37	14,31	17,89	0,002
<i>p-valor</i>	0,04	0,019	0,098	0,226	

*Quatro pacientes apresentaram involução no perfil de colonização/infecção por *P. aeruginosa* e, portanto, foram excluídos dessa análise.

No entanto, somente no primeiro e segundo período de coletas essa diferença foi estatisticamente significativa (**Tabela 12**). Quando feitas as análises dentro de cada grupo, observou-se um aumento progressivo dos níveis de anticorpos tanto dos pacientes que apresentaram evolução do perfil de colonização/infecção por *P. aeruginosa* quanto dos que não apresentaram, com diferença significativa.

Observamos que 12 pacientes apresentaram, no início do acompanhamento, níveis de anticorpos acima do valor de corte estabelecido, enquanto os 66 restantes apresentaram níveis de anticorpos abaixo desse valor. O risco de evolução no perfil de colonização/infecção por *P. aeruginosa* foi maior para os pacientes que apresentaram níveis acima do valor de corte no início do acompanhamento (OR = 3,13; IC: 0,883 – 11,06). Entre os pacientes que apresentaram evolução no perfil de colonização/infecção por *P. aeruginosa*, sete pacientes adquiriram infecção crônica. Foi observado que os níveis de anticorpos desses pacientes eram significativamente maiores, em relação aos que não adquiriram a infecção crônica, já no início do estudo e continuaram maiores no decorrer do estudo, porém, apenas no primeiro e segundo períodos de coleta essa diferença foi estatisticamente significativa (**Tabela 13**). Dos pacientes que apresentavam cultura negativa para *P. aeruginosa* no início do estudo, 15 passaram a apresentar cultura microbiológica positiva. Nesse grupo, foi possível detectar a presença da bactéria no organismo antes ou simultaneamente ao primeiro isolamento em cultura em 11 pacientes (73,3%). Em um paciente, a resposta de anticorpos ocorreu 15 meses antes do primeiro isolamento de *P. aeruginosa* em cultura. Em 20 pacientes, os níveis de anticorpos aumentaram, apesar da ausência de cultura positiva para *P. aeruginosa* até o fechamento do estudo.

Tabela 13: Diferença dos níveis de anticorpos entre pacientes que adquiriram ou não infecção crônica por *P. aeruginosa*.

Aquisição de infecção crônica	Mediana dos níveis de anticorpos (U/mL)				p-valor
	Início	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta	
Sim	15,94	87,36	25,86	124,45	0,241
Não	5,59	5,98	19,58	19,38	0,034
p-valor	0,02	0,008	0,261	0,087	

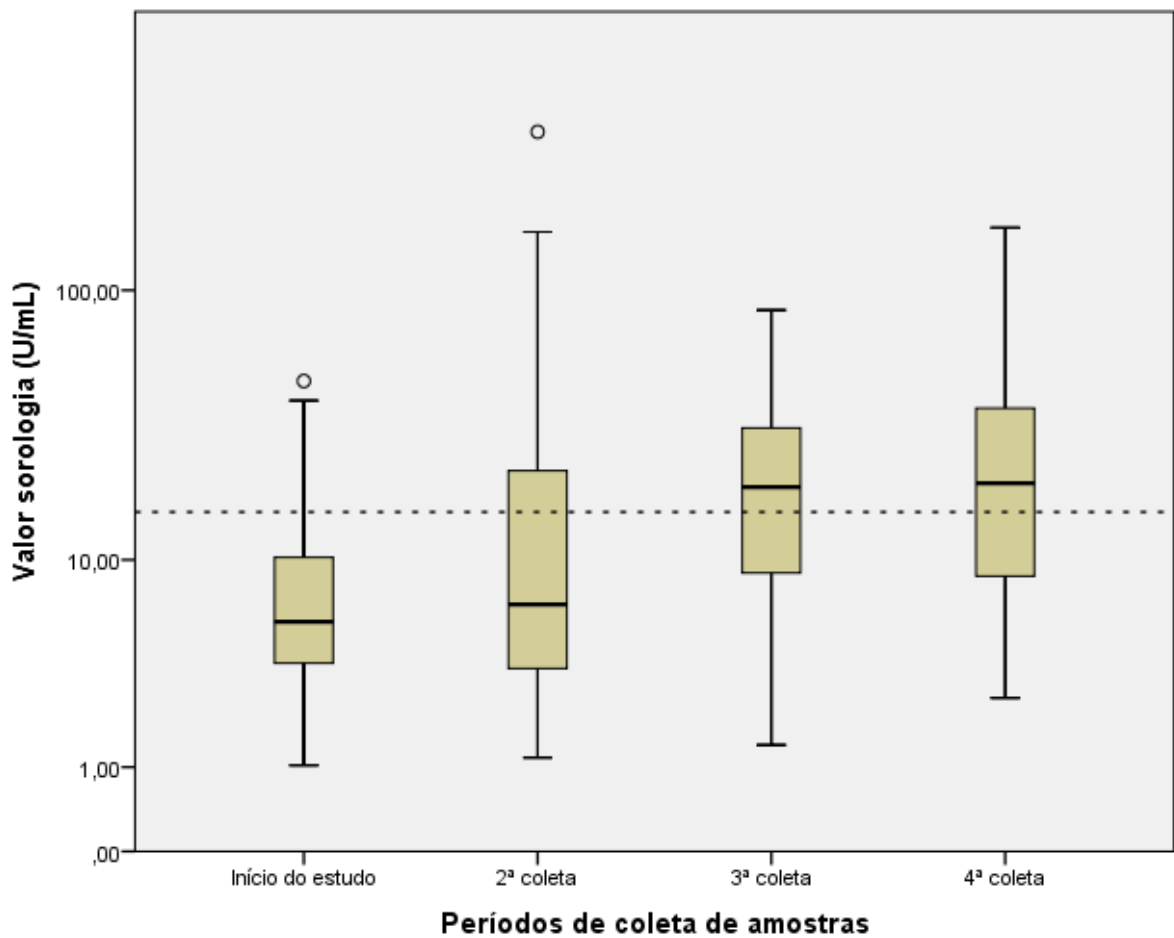


Figura 11: Box-plot da distribuição dos níveis de anticorpos em quatro diferentes períodos de coleta de amostras, considerando todos os pacientes incluídos no estudo longitudinal. A linha pontilhada representa o valor de corte positivo estabelecido para o método (15,3 U/mL).

9. DISCUSSÃO

A resposta de anticorpos contra *P. aeruginosa* na FC é um marcador de infecção crônica, inflamação e dano tecidual (85). Estudos têm mostrado o potencial da detecção de anticorpos séricos para o diagnóstico precoce da infecção pulmonar por *P. aeruginosa* nas últimas três décadas (61,87,92,102,109), a fim de iniciar precocemente a terapia antimicrobiana de erradicação (101).

Em nosso estudo, procuramos avaliar a utilidade de um teste ELISA para pesquisa de anticorpos anti-*Pseudomonas* em dois cenários, primeiramente fazendo uma avaliação em estudo de corte transversal, buscando a padronização, otimização e determinação da acurácia da técnica, e, paralelamente, uma avaliação longitudinal, visando observar possíveis alterações nos níveis de anticorpos nos diferentes momentos de coleta de amostras, para avaliar a potencial capacidade de detecção precoce da sorologia.

No estudo transversal, observamos uma diferença significativa nos níveis de anticorpos entre todos os grupos de pacientes com FC, de modo geral, e sujeitos presumidamente saudáveis. Os níveis foram significativamente mais altos nos pacientes infectados crônicos por *P. aeruginosa* em relação aos outros grupos avaliados (**Tabela 5; Figura 10**), o que correspondeu às expectativas, devido ao estágio mais avançado da infecção, onde há maior resposta inflamatória com maior dano pulmonar. Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos, que mostraram resposta de anticorpos significativamente maior em pacientes infectados crônicos contra diversos antígenos de *P. aeruginosa*. Brett *et al.* mostraram, em dois estudos (90,95), pacientes com presença contínua de *P. aeruginosa* em cultura microbiológica com níveis de anticorpos mais altos contra antígenos de parede celular da bactéria; o aumento dos níveis ocorreu devido ao aumento da carga bacteriana. Hollsing *et al.* (108) relataram níveis altos contra fosfolipase C sendo encontrados exclusivamente em pacientes infectados crônicos por *P. aeruginosa*. Outros estudos mostraram uma maior resposta de anticorpos contra ExoA, ELA e PA (105,107,118,119) e St-Ag:1-17 (88,102) em pacientes com infecção crônica, quando comparados aos outros grupos.

No estágio de infecção pulmonar crônica, também há o aparecimento de *P. aeruginosa* mucóide, fenótipo que está associado a uma maior gravidade da infecção.

Döring *et al.* (87) mostraram uma maior produção de anticorpos precipitantes quando houve a persistência do fenótipo mucóide nos pulmões, levando a uma maior formação de imunocomplexos. Brett *et al.* (90) e Hollsing *et al.* (108) observaram altos níveis de anticorpos contra ExoA, ELA e PA entre pacientes colonizados/infectados por *P. aeruginosa* mucóide em relação aos que não apresentaram esse fenótipo. West *et al.* (101) mostraram a ocorrência de uma sequência na produção de anticorpos de acordo com diferentes antígenos; a resposta contra ExoA foi mais precoce, em relação à resposta contra lisado celular e ELA, a qual foi a resposta mais tardia e foi preditiva de infecção mais avançada, podendo refletir o desenvolvimento da infecção crônica. Tramper-Standers *et al.* (103) também mostraram a resposta contra ELA tendo uma maior sensibilidade para detecção da infecção crônica. Doğru *et al.* (94) relataram que a resposta à ELA foi a mais entre pacientes infectados crônicos e a menos intensa entre pacientes com cultura negativa para *P. aeruginosa*. No presente estudo, também houve uma expressiva diferença dos níveis de anticorpos contra o St-Ag:1-17 entre os pacientes colonizados/infectados por *P. aeruginosa* mucóide (**Tabela 6**) em relação aos que não apresentaram esse fenótipo, corroborando os relatos prévios.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre pacientes com FC livres de infecção e sujeitos presumidamente saudáveis (**Tabela 5; Figura 10**). Isso pode ocorrer devido às faixas etárias similares desses dois grupos, já que encontramos uma correlação positiva entre níveis de anticorpos e idade, tanto nos pacientes com sorologia positiva quanto nos controles sadios. Høiby *et al.* (85) mostraram que anticorpos precipitantes contra o St-Ag:1-17 aumentaram gradativamente com a idade em população normal, possivelmente devido à reação cruzada com outros microorganismos. O St-Ag:1-17 possui 10 antígenos que provocam reação cruzada com outras bactérias gram-negativas, incluindo o *Haemophilus influenzae*, comum no trato respiratório da população normal. Pedersen *et al.* (88) mostraram, em controles sadios, correlação significativa entre níveis de anticorpos contra o St-Ag:1-17 medidos por ELISA e idade, também atribuindo às reações cruzadas ocorridas naturalmente. Outros autores, porém, encontraram que não houve diferença, em controles sadios e pacientes, dos níveis de anticorpos de acordo com a idade, tanto na resposta contra antígenos de parede celular (90) quanto na resposta contra lisado celular e rPcrV, uma proteína do SSTT (120). Apesar de não termos encontrado em nosso

estudo transversal diferença estatística nos níveis de anticorpos entre controles sadios e pacientes com FC livres de infecção, apenas um controle sadio apresentou sorologia positiva. Sendo a *P. aeruginosa* um patógeno ambiental encontrado em vários habitats, também é possível que esse indivíduo tenha entrado em contato com a bactéria em um período próximo ao estudo, levando à formação transitória de anticorpos, como destacado por estudos anteriores (88,90,103,118), embora alguns autores considerem que há uma variação individual considerável dos níveis de anticorpos anti-*Pseudomonas* (61,105,106,118). No Brasil, devido à adversidade das condições climáticas e ambientais, há, possivelmente, uma maior ocorrência do contato com a bactéria, o que pode causar uma resposta basal aumentada contra o patógeno. Isso pode explicar nosso alto valor de cut-off em relação àquele adotado pelo fabricante do antígeno utilizado no presente estudo (61,102).

Houve uma maior porcentagem de concordância entre os resultados de cultura microbiológica e sorologia, no estudo transversal, dos pacientes nunca colonizados por *P. aeruginosa* (97.1%) quando comparados com os pacientes livres de infecção (89.9%), com diferença significativa na mediana dos níveis de anticorpos. Entretanto, 2.9% dos pacientes nunca colonizados e 11.1% dos pacientes livres de infecção apresentaram resultados positivos de sorologia, o que sugere limitações na cultura microbiológica, a qual pode não refletir a microbiota pulmonar (91,121,122). Os resultados do acompanhamento longitudinal reforçam essa afirmação. Observamos aumento progressivo dos níveis entre os pacientes considerados inicialmente como cultura negativa para *P. aeruginosa*, sendo este aumento maior entre os pacientes livres de infecção (**Tabela 9**). Uma parte desses pacientes, mais tarde, apresentou cultura positiva para *P. aeruginosa*, o que levou a uma evolução em seus perfis de colonização/infecção; entretanto, mesmo entre os pacientes que não apresentaram tal evolução, em 28 pacientes houve aumento dos níveis de anticorpos com o passar do tempo com grande significância estatística(**Tabela 10**). Desses, 22 pacientes tiveram amostras respiratórias coletadas por meio de swab de orofaringe. Sendo assim, a resposta de anticorpos aumentada nesses pacientes pode indicar o surgimento da infecção (em pacientes classificados como nunca colonizados) ou infecção recorrente (em pacientes classificados como livres de infecção). Em pacientes capazes de expectorar, culturas de escarro refletem com boa acurácia os microorganismos das vias aeríferas

inferiores. Porém, em pacientes com idade insuficiente para fornecer um material representativo, o único método não invasivo de coleta de secreções respiratórias é o swab de orofaringe (5). Armstrong *et al.* (123), comparando culturas de LBA e swab de orofaringe com a eletroforese por campo pulsado concluíram que as culturas de swab não predizem com confiança a presença de patógenos bacterianos nas vias aeríferas inferiores de crianças pequenas. Rosenfeld *et al.* (8) encontraram que culturas de orofaringe tiveram baixa sensibilidade (44%), porém alta especificidade (95%) para a detecção de *P. aeruginosa*. Porém, nessa análise, o LBA foi utilizado como padrão-ouro; é sabido que erros de amostragem podem ocorrer durante o procedimento de LBA, ocasionando resultados falsos-negativos. Burns *et al.* (91) destacam que a cultura de LBA faz uma amostragem regional do pulmão, o que pode não refletir a microbiota do pulmão como um todo; também chamam a atenção para a incapacidade de amostrar bactérias aderentes à placas mucosas e a cultura, para haver positividade, requer a presença de organismos viáveis. Anstead *et al.* (105) notaram que níveis de anticorpos positivos contra PA e ExoA estiveram significativamente associados com um risco mais alto de isolamento recorrente de *P. aeruginosa*. Esses dados sugerem que um isolamento anterior de *P. aeruginosa* pode predispor um paciente a um isolamento subsequente em um período de tempo mais curto. Anteriormente, Brett *et al.* (90) encontraram um paciente que, após terapia antimicrobiana para erradicação de *P. aeruginosa*, apresentou novo isolamento da bactéria em cultura 5 meses depois, com níveis aumentados de anticorpos contra antígenos da parede celular, caracterizando, desse modo, uma provável infecção recorrente.

Em nosso estudo transversal, entre pacientes com FC nunca colonizados e o grupo controle negativo, também não foi observada diferença significativa nos níveis de anticorpos, o que já foi mostrado anteriormente (61) e é esperado, pelo fato de o grupo de pacientes nunca colonizados ser composto majoritariamente por recém nascidos e crianças menores de 7 anos, idade na qual há menor incidência e prevalência de *P. aeruginosa*.

Também não observamos diferença estatisticamente significativa dos níveis de anticorpos entre pacientes com FC livres de infecção e pacientes com colonização intermitente no estudo transversal (**Tabela 5; Figura 10**). A maioria (67%) dos pacientes com colonização intermitente apresentou níveis de anticorpos abaixo do valor de corte por nós estabelecido; entretanto, é sabido que o isolamento de *P. aeruginosa* em cultura não

necessariamente indica infecção, ao menos que haja uma resposta humoral específica para o patógeno (86,91,119). Proesmans *et al.* (119) obtiveram dados semelhantes e, como principal explicação para tal, destacaram o frequente intercâmbio de pacientes entre esses dois grupos com o passar dos anos. De fato, quando observados nossos dados microbiológicos longitudinais, a maior frequência de intercâmbio de pacientes entre diferentes perfis de colonização/infecção por *P. aeruginosa* se deu entre o grupo de pacientes livres de infecção e os pacientes com colonização intermitente (dados não mostrados). No acompanhamento longitudinal, mostramos que os níveis de anticorpos dos pacientes inicialmente classificados como livres de infecção superaram os dos pacientes inicialmente classificados como colonização intermitente (**Tabela 9**), sendo que 11 sujeitos do primeiro grupo mudaram seus perfis de colonização/infecção para colonização intermitente e 4 pacientes inicialmente classificados como colonização intermitente se tornaram livres de infecção. Brett *et al.* (89,94) também relataram alguns pacientes com colonização intermitente apresentando níveis de anticorpos normais contra antígenos da parede celular. Sugerem que a ausência de resposta humoral sistêmica pode ser devida à presença de cepas transitórias ou não patogênicas de *P. aeruginosa*. Sugerem ainda, como alternativa, que pode ser decorrente de uma resposta adequada do hospedeiro por meio da IgA secretória ou mesmo resposta imune inadequada ao patógeno. Entretanto, 33% dos pacientes com colonização intermitente em nosso estudo transversal apresentaram níveis acima do valor de corte, com diferença significativa em relação aos pacientes nunca colonizados e sujeitos saudáveis. Isso pode sugerir mudança no perfil de colonização/infecção desses pacientes, os quais provavelmente são infectados crônicos não detectados pela cultura. Nossos dados longitudinais mostraram que sete pacientes adquiriram a infecção crônica durante o estudo. Nesses, os níveis de anticorpos foram significativamente maiores no primeiro e segundo períodos de coleta de amostras, em relação aos que não se tornaram infectados crônicos (**Tabela 11**). Porém, não houve diferença estatística entre os dois grupos no restante do estudo, sugerindo possível detecção da infecção crônica ainda não mostrada pela cultura microbiológica, o que é reforçado pelo fato de termos detectado aumento dos níveis de anticorpos até 15 meses antes da identificação da bactéria em cultura microbiológica e um risco, em média, três vezes maior de evolução no perfil de colonização/infecção entre pacientes que apresentaram níveis de

anticorpos elevados no primeiro período de coleta. Döring e Høiby (87) mostraram níveis de anticorpos contra o St-Ag:1-17 com aumento progressivo em 90% dos pacientes adquiriram infecção crônica durante o estudo. Pressler *et al.*, em dois estudos (61,102) mostraram níveis de anticorpos aumentados em pacientes que posteriormente se tornaram cronicamente infectados por *P. aeruginosa*, o que ocorreu até três anos antes da identificação pela cultura microbiológica (61), sendo que o aumento dos níveis foi um forte fator de risco para a aquisição da infecção crônica. Brett *et al.* (90) mostraram uma sobreposição entre os níveis de anticorpos de pacientes infectados crônicos e com colonização intermitente, refletindo, para a época, a divisão arbitrária entre os dois grupos. Pedersen *et al.* (88), comparando pacientes infectados crônicos e com colonização intermitente, encontraram um VPP de 87% e VPN de 72% para a detecção de anticorpos contra o St-Ag:1-17, mostrando que a colonização intermitente pode levar à formação de anticorpos específicos. Pressler *et al.* (61) também mostraram pacientes intermitentes com altos níveis de anticorpos contra St-Ag:1-17, sugerindo que a medida desses níveis possui valor diagnóstico potencial para esse grupo de pacientes, o qual é um grupo de risco para aquisição da infecção crônica. Alguns autores (58,60,124) destacam que a transição do estado de colonização intermitente para infecção crônica é caracterizada pela produção de cepas mucóides de *P. aeruginosa* e tal transição está associada à uma resposta de anticorpos aumentada. Em alguns centros, a medida de níveis de anticorpos é utilizada para distinguir entre colonização intermitente e infecção crônica por *P. aeruginosa* (102). Nossos resultados mostram alto VPP (96.8%) e VPN (98.1%) da sorologia para pesquisa de anticorpos contra St-Ag:1-17 para a detecção da infecção crônica e, portanto, alta probabilidade da ocorrência de infecção crônica por *P. aeruginosa* quando o paciente apresenta níveis positivos de anticorpos. Esses resultados chamam atenção para limitações nos critérios de Leeds (86), os mais utilizados para definição de perfis de colonização e infecção, e baseados apenas em culturas microbiológicas de material respiratório. Novos critérios foram propostos recentemente para a melhor definição dos perfis de colonização/infecção (125), salientando a importância da inclusão de resultados sorológicos para tal. Sugerem que 6 a 8 amostras de material respiratório sejam coletadas a cada ano, juntamente com amostras de sangue trimestrais para pesquisa de anticorpos, e que a classificação do perfil de colonização intermitente, bem como de pacientes com cultura

negativa para *P. aeruginosa*, seja baseada em níveis de anticorpos abaixo do valor de corte estabelecido para infecção crônica.

No estudo transversal, um paciente considerado infectado crônico por *P. aeruginosa* apresentou níveis de anticorpos abaixo do valor de corte por nós estabelecido. O prontuário desse paciente foi revisado e encontramos que, no momento da coleta, o paciente estava sob regime de terapia anti-*Pseudomonas* com tobramicina intravenosa, além de tratamento com corticosteróides. Tais tratamentos provavelmente levaram ao decréscimo dos níveis de anticorpos. Brett *et al.* (90) seguiram dois pacientes e monitoraram a resposta de anticorpos durante o tratamento com antibióticos; notaram queda nos níveis de anticorpos em ambos os pacientes após 18 meses. Mais tarde, Brett *et al.* (95) encontraram que alguns pacientes aparentemente tiveram a infecção por *P. aeruginosa* erradicada após tratamento endovenoso por quatro semanas com diferentes tipos de antimicrobianos. Tais pacientes tinham um estado clínico levemente pior do que os pacientes que não foram submetidos à terapia; um ano depois, essa situação foi revertida. No mesmo estudo, dois pacientes foram seguidos durante tratamento com o corticosteróide prednisona durante 32 meses. Em ambos, houve queda dos níveis de anticorpos contra antígenos da parede celular para abaixo do ponto de corte definido. Johansen *et al.* (106), em um período de 30 anos de seguimento de 157 pacientes, introduziram cursos de duas semanas de terapia antimicrobiana a cada três meses em todos os pacientes com infecção crônica por *P. aeruginosa* e terapia precoce agressiva com colistina inalatória e ciprofloxacina via oral por três meses quando pacientes anteriormente não colonizados apresentaram isolamento de *P. aeruginosa* em cultura. Encontraram que pacientes tratados intensivamente apresentaram resposta de anticorpos diminuída contra o St-Ag:1-17 e sobrevivência aumentada após a aquisição da infecção crônica. Ratjen *et al.* (107) seguiram 43 pacientes durante 12 meses de terapia inalatória anti-*Pseudomonas*. Encontraram que os níveis de anticorpos contra ExoA, ELA e PA diminuíram, com aumento da taxa de sobrevivência, em pacientes nos quais a terapia de erradicação foi bem sucedida. Em contrapartida, em pacientes nos quais a terapia de erradicação não teve sucesso, os níveis de anticorpos contra os três antígenos aumentaram e a taxa de sobrevivência diminuiu.

Para avaliar a acurácia da sorologia, assumimos a cultura microbiológica como padrão de referência, considerando os pacientes com FC e infecção crônica para *P.*

aeruginosa como tendo presença certa de infecção e o grupo controle negativo como tendo ausência certa de infecção. Desse modo, obtivemos excelentes valores de sensibilidade (96.8%), especificidade (98.1%), VPP (96.9%) e VPN (98.1%) (**Tabela 7**). Tais valores são controversos na literatura. Em trabalho anterior (109), mostramos que os estudos apresentam valores altamente variados de sensibilidade, especificidade e valores preditivos. Dois estudos em 2006 se destacaram por seus dados conflitantes publicados na mesma revista. Kappler *et al.* (118), avaliando 183 pacientes, relataram que a sorologia para anticorpos contra ExoA, ELA e PA apresentou, de modo geral, uma sensibilidade de 86%, especificidade de 96% e VPP de 97%, propondo que a terapia antimicrobiana fosse iniciada no evento da subida dos níveis de anticorpos, mesmo na ausência de cultura positiva. Tramper-Standers *et al.* (103), utilizando os mesmos antígenos, avaliaram a resposta de anticorpos em 220 pacientes, encontrando sensibilidade de 96% e especificidade de 79%, além de terem encontrado 15 conversões dos níveis de anticorpos durante o período de estudo, com padrões variados de resposta. Chamam a atenção para a possibilidade de falha na identificação da infecção precoce através do uso de métodos sorológicos. Mais recentemente, outro estudo também gerou controvérsia sobre o assunto. Douglas *et al.* (110) descreveram resultados pareados de sorologia e cultura microbiológica de LBA, encontrando um baixo VPP e alto VPN para a sorologia, questionando o potencial diagnóstico do método para o monitoramento da infecção por *P. aeruginosa*. Porém, admitem que a cultura de LBA pode apresentar resultados falsos-negativos, devido às falhas de amostragem durante o procedimento de coleta de amostra.

As controvérsias e variações nos resultados com respeito à acurácia da sorologia são esperadas e relacionadas a vários fatores, incluindo os critérios utilizados para a seleção de pacientes e grupo controle, estado imunológico dos pacientes no momento da coleta de amostra, propriedades intrínsecas dos métodos sorológicos, método de preparação da solução de antígenos, método para cálculo do valor de corte, dentre outros. Uma reação imunoenzimática para detecção de anticorpos específicos requer que as concentrações de todos os reagentes sejam otimizadas (115,116). Um consenso a respeito da padronização de diferentes testes sorológicos seria muito importante para o melhor uso deste recurso diagnóstico. No presente estudo, diferentes concentrações do antígeno, amostras de soro e conjugado foram testadas, bem como houve um cálculo minucioso do valor de corte,

buscando pelo melhor discernimento entre presença e ausência de infecção. Um estudo recente (104), avaliando níveis de anticorpos em crianças com diagnóstico de FC através da triagem neonatal, mostrou que a determinação regular dos níveis de anticorpos pode ser uma ferramenta diagnóstica valiosa se valores de corte específicos para cada faixa etária forem usados ao invés de valores fixos. Nossos dados corroboram esses resultados, já que encontramos uma boa correlação entre níveis de anticorpos e idade. De modo geral, a maioria dos estudos mostrou uma boa concordância entre níveis de anticorpos, resultados de cultura microbiológica e parâmetros clínicos (88,94,102,103,107,109,119).

No estudo longitudinal, de modo geral, observamos, agrupando todos os pacientes avaliados, um aumento progressivo dos níveis de anticorpos com o tempo (**Figura 11**). Estudos anteriores mostraram resultados parecidos (61,87,89,90,95,102), sugerindo produção permanente dos antígenos de *P. aeruginosa* nos pulmões e presença contínua dos mesmos, além de mostrarem padrões variados de resposta entre os pacientes (90,94,95,103), o que foi também visto no presente estudo. Melhores resultados devem ser alcançados com um tempo de seguimento maior e coletas mais assíduas, como já realçado anteriormente (88,109,119), complementando achados microbiológicos.

10. CONCLUSÃO

No estudo transversal, a técnica de ELISA para dosagem de anticorpos séricos contra *P. aeruginosa* em pacientes com FC se mostrou altamente sensível e específica, além de mostrar altos valores preditivos para a detecção da infecção crônica por *P. aeruginosa*. Quanto ao estudo longitudinal, nossos dados ainda não são conclusivos, devido ao curto período de seguimento e quantidade insuficiente de amostras coletadas de cada paciente, o que não permite fazer maiores inferências. Até o momento, porém, observamos uma tendência de aumento contínuo dos níveis de anticorpos e uma potencial capacidade de detecção precoce da infecção pulmonar por *P. aeruginosa* por meio da sorologia, a qual se trata de uma técnica simples, de fácil execução e baixo custo, devendo ser incorporada à rotina de acompanhamento dos pacientes com FC.

Recomendamos que sejam feitas ao menos duas coletas de sangue anuais de pacientes que apresentarem cultura negativa para *P. aeruginosa* seguidas de um primeiro

resultado sorológico negativo e coletas mais frequentes de pacientes que apresentarem um primeiro resultado sorológico positivo, mesmo na ausência de cultura positiva, o que implica um maior risco de posterior aparecimento da bactéria em cultura. Ademais, outros parâmetros clínicos e diagnósticos devem ser levados em conta, como exacerbações pulmonares, testes de função pulmonar e achados de imagem, o que poderá ajudar na diferenciação entre colonização e infecção por *P. aeruginosa*. Nesses casos, a detecção precoce por meio da sorologia poderá permitir uma intervenção precoce por meio de antibioticoterapia. A influência da terapia antimicrobiana sobre a variação dos níveis de anticorpos também deve ser melhor investigada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic Fibrosis. **Lancet** 2009;373:1891-904.
2. Ratjen F, Döring G. Cystic Fibrosis. **Lancet** 2003;361:681-9.
3. Gilligan PH, Kiska DL, Appleman MD. Cystic fibrosis microbiology. In: Appleman MD. Cumulative techniques and procedures in clinical microbiology. Washington, DC: ASM Press; 2006, p. 1-36.
4. Saiman L, Seigel J. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference on infection Control Participants. Infection Control Recommendations for patients with Cystic Fibrosis: microbiology, important pathogens, and infection control practices to prevent patient-to-patient transmission. **Am J Infect Control** 2003;31:1-52.
5. Tramper-Stranders GA, van der Ent CK, Wolfs TFW. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. **J Cyst Fibros** 2005;4:37-43.
6. Döring G, Conway SP, Heijerman HG, Hodson ME, Høiby N, Smyth A, *et al.* Antibiotic Therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis: a European Consensus. **Eur Resp J** 2000;16:749-67.
7. Hauser A, Jain M, Bar-Meir M. Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. **Clin Microbiol Rev** 2011;24(1):29-70.
8. Rosenfeld M, Emerson J, Accurso F *et al.* Diagnostic accuracy of oropharyngeal cultures in infants and young children with cystic fibrosis. **Pediatr Pulmonol** 1999;28:321-8.
9. Da Silva Filho LVF, Ferreira FA, Reis FJC *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis: scientific evidence regarding clinical impact, diagnosis and treatment. **J Bras Pneumol** 2013;39(4):495-512.
10. Döring G, Taccetti G, Campana S *et al.* Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. **Eur Resp J** 2005;27(3):653
11. Ratjen F, Döring G, Nikolaizik WH. Effect of inhaled tobramycin on early *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in patients with cystic fibrosis. **Lancet** 2001;358:983-4.

12. Paschoal IA, Pereira MC. **Fibrose Cística**. São Caetano do Sul/SP: Yendis Editora, 2010, 444p.
13. Andersen DH, Hodges RC. Celiac syndrome. Genetics of the cystic fibrosis of the pancreas and other conditions. **Pediatrics** 1951;8:648-56.
14. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. **Am J Respir Crit Care Med** 2003;168(8):918-51.
15. Clancy JP. Cystic Fibrosis: epidemiology, pathophysiology and medical complications. **Adv Stud Med** 2007;7(14):432-9.
16. Davis PB, Drumm M, Konstan MV. Cystic fibrosis. **Am J Respir Crit Care Med** 1996;154:1229-56.
17. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry: **2006 annual data report to the center directors**; 2007.
18. Knowles MR, Drumm M. The influence of genetics on cystic fibrosis phenotypes. **Cold Spring Harb Perspect Med** 2012; doi: 10,1101/cshperspect.a009548.
19. Strausbaugh SD, Davis PB. Cystic Fibrosis: a review of Epidemiology and Pathology. **Clin Chest Med** 2007:28-279-88.
20. Lao O, Andres AM, Mateu E, Bertranpetit J, Celafell F. Spatial patterns of cystic fibrosis mutation spectra in European populations. **Eur J Hum Genet** 2003;11:385.
21. Walters S, Metha A. Epidemiology of cystic fibrosis. In: Hodson M, Geddes DM, Bush A, eds. **Cystic Fibrosis**, 3rd edition. London: Edward Arnold Ltd., 2007:21-45.
22. Ribeiro JD, Ribeiro MA, Ribeiro AF. Controvérsias na fibrose cística – do pediatra ao especialista. **J Pediatr (Rio J)** 2002;78(2):S171-186.
23. Borowitz D, Baker R, Stallings V. Consensus report on nutrition for pediatric patients with cystic fibrosis. **J Pediatr Gastroenterol Nutr** 2002;35:246-59.
24. Wilschanski M, Durie PR. Patterns of GI disease in adulthood associated with mutations in the CFTR gene. **Gut** 2007;56:1153-63.
25. Marshall BC, Butler SM, Stoddard M, Moran AM, Liou TG, Morgan WJ. Epidemiology of cystic fibrosis-related diabetes. **J Pediatr** 2005;146:681-87.

26. Elder DA, Wooldridge JL, Dolan LM, D'Alessio DA. Glucose tolerance, insulin secretion and insulin sensitivity in children and adolescents with cystic fibrosis and no prior history of diabetes. **J Pediatr** 2007;151:653-8.
27. Aris RM, Merkel PA, Bachrach LK, Borowitz DS, Boyle MP, Elkin SL *et al.* Guide to bone health and disease in cystic fibrosis. **J Clin Endocrinol Metab** 2005;90:1888-96.
28. Boyle MP. Nonclassic cystic fibrosis and CFTR-related diseases. **Curr Opin Pulm Med** 2003;9:498-503.
29. Yankaskas JR, Marshall BC, Sufian B, Simon RH, Rodman D. Cystic fibrosis adult care: consensus conference report. **Chest** 2004;125:1S-39.
30. McMullen AH, Pasta DJ, Frederick PD, Konstan MW, Morgan WJ, Schechter MS, Wagener JS. Impact of pregnancy on women with cystic fibrosis. **Chest** 2006;129:706-11.
31. Matsui H, Wagner VE, Hill DB, Schwab UE, Rogers TD, Button B *et al.* A physical linkage between cystic fibrosis airway surface dehydration and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **PNAS** 2006;103(48):18131-6.
32. Clunes MT, Boucher RC. Cystic fibrosis: the mechanisms of pathogenesis of an inherited lung disorder. **Drug Discov Today Dis Mech** 2007;4(2):63-72.
33. Stenbit AE, Flume PA. Pulmonary exacerbations in cystic fibrosis. **Curr Opin Pulm Med** 2011;17:442-7.
34. Gilligan PH. Infections in patients with Cystic Fibrosis: Diagnostic Microbiology Update. **Clin Lab Med** 2014:197-217.
35. Middleton PG, Chen SC, Meyer W. Fungal Infections and treatment in cystic fibrosis. **Curr Opin Pulm Med** 2013;19(6):670-5.
36. Cystic Fibrosis Foundation. 2012. **Patient Registry 2012. Annual data report to the center directors.** Cystic Fibrosis Foundation, Bethesda, MD.
37. Razvi SL, Quittell A, Sewall H, Quinton BM, Saiman L. Respiratory microbiology of patients with cystic fibrosis in the United States, 1995-2005. **Chest** 2009;136:1554-60.

38. Millar FA, Simmonds NJ, Hodson ME. Trends in pathogens colonizing the respiratory tract of adult patients with cystic fibrosis, 1985-2005. **J Cyst Fibros** 2009;8(6):386-91.
39. 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;10:841-51.
40. Wilmott RW, Tyson SL, Matthew DJ. Cystic fibrosis survival rates. The influences of allergy and *Pseudomonas aeruginosa*. **Am J Dis Child** 1985;139:669-71.
41. Courtney JM, Bradley J, McCaughan J, O'Connor TM, Shortt C, Bredin CP *et al*. Predictors of mortality in adults with cystic fibrosis. **Pediatr Pulmonol** 2007;42:525-32.
42. Demko CA, Bryard PJ, Davis PB. Gender differences in cystic fibrosis: *Pseudomonas aeruginosa* infection. **J Clin Epidemiol** 1995;48:1041-9.
43. Hudson VL, Wielinski CL, Regelman WE. Prognostic implications of initial oropharyngeal bacterial flora in patients with cystic fibrosis diagnosed before the age of two years. **J Pediatr** 1993;122:854-60.
44. Nixon GM, Armstrong DS, Carzino R, Carlin JB, Olinsky A, Robertson CF, Greenwood K. Clinical outcome after early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. **J Pediatr** 2001;138:699-704.
45. Hudson VL, Wielinski CL, Regelman WE. Prognostic implications of initial oropharyngeal bacterial flora in patients with cystic fibrosis diagnosed before the age of two years. **J Pediatr** 1993;122:854-60.
46. Kerem E, Corey M, Gold R, Levison H. Pulmonary function and clinical course in patients with cystic fibrosis after pulmonary colonization with *Pseudomonas aeruginosa*. **J Pediatr** 1990;116:714-9.
47. Konstan MW, Morgan WJ, Butler SM, Pasta DJ, Craib ML, Silva SJ *et al*. Risk factors for rate of decline in forced expiratory volume in one second in children and adolescents with cystic fibrosis. **J Pediatr** 2007;151:134-9.
48. Kosorok MR, Zeng L, West SE, Rock MJ, Splaingard ML, Laxova A *et al*. Acceleration of lung disease in children with cystic fibrosis after *Pseudomonas aeruginosa* acquisition. **Pediatr Pulmonol** 2001;32:277-87.

49. Pamucku A, Bush A, Buchdahl R. Effects of *Pseudomonas aeruginosa* colonization on lung function and anthropometric variables in children with cystic fibrosis. **Pediatr Pulmonol** 1995;19:10-15.
50. Winnie GB, Cowan RG. Respiratory tract colonization with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: correlations between anti-*Pseudomonas aeruginosa* antibody levels and pulmonary function. **Pediatr Pulmonol** 1991;10:92-100.
51. Abman SH, Ogle JW, Harbeck RJ, Butler-Simon N, Hammond KB, Accurso FJ. Early bacteriologic, immunologic, and clinical courses of young infants with cystic fibrosis. **J Pediatr** 1991;119:211-7.
52. Robinson TE, Leung AN, Chen X, Moss RB, Emond MJ. Cystic fibrosis HRCT scores correlate strongly with *Pseudomonas* infection. **Pediatr Pulmonol** 2009;44:1107-17.
53. Segel SD, Gibson RL, Emerson J, McNamara S, Burns JL, Wagener JS, Ramsey BW. Impact of *Pseudomonas* and *Staphylococcus* infection on inflammation and clinical status in young children with cystic fibrosis. **J Pediatr** 2009;154:183-88.
54. Iacocca VF, Sibinga M, Barbero GJ. Respiratory tract bacteriology in cystic fibrosis. **Am J Dis Child** 1963;106:315-24.
55. Deretic VM, Schurr MJ, Hongwei Y. *Pseudomonas aeruginosa* mucoidy and the chronic infection phenotype in cystic fibrosis. **Trends Microbiol** 1995;3:351-6.
56. Govan JRW, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. **Microbiol Rev** 1996;60:539-74.
57. Govan JRW, Nelson JW. Microbiology of lung infection in cystic fibrosis. **Br Med Bull** 1992;48:912-30.
58. Li Z, Kosorok MR, Farrell PM, Laxova A, West SE, Green CG *et al.* Longitudinal development of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis. **JAMA** 2005;293:581-8.
59. Johansen HK, Høiby N. Seasonal onset of initial colonization and chronic infection with *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis in Denmark. **Thorax** 1992;47:109-11.

60. Pedersen SS. Lung infection with alginate-producing, mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. **APMIS** 1992;28:1-79.
61. Pressler T, Frederiksen B, Skov M, Garred P, Koch C, Høiby N. Early rise of anti-*Pseudomonas* antibodies and a mucoid phenotype of *Pseudomonas aeruginosa* are risk factors for development of chronic lung infection – a case control study. **J Cyst Fibros** 2006;5:9-15.
62. Ballmann M, Rabsch P, von der Hardt H. Long-term follow-up of changes in FEV1 and treatment intensity during *P. aeruginosa* colonization in patients with cystic fibrosis. **Thorax** 1998;53:732-7.
63. Farrell PM, Collins J, Broderick LS, Rock MJ, Li Z, Kosorok MR *et al.* Association between mucoid *Pseudomonas* infection and bronchiectasis in children with cystic fibrosis. **Radiology** 2009;252:534-43.
64. Henry RL, Dorman DC, Brown J, Mellis C. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. **Aust Pediatr J** 1982;12:158-61.
65. Hoffman LR, Deziel E, D'Argenio DA, Lepine F, Emerson J, McNamara S *et al.* Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.** 2006;103:19890-5.
66. Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Seanphimmachak C, Hoffman LR, D'Argenio DA *et al.* Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.** 2006;103:8487-92.
67. Ernst RK, D'Argenio DA, Ichikawa JK, Bangera MG, Selgrade S, Burns JL *et al.* Genome mosaicism is conserved but not unique in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the airways of young children with cystic fibrosis. **Environ Microbiol** 2003; 5:1341-49.
68. Roy-Burman A, Savel R, Racine S, Swanson BL, Ravadigar NS, Fujimoto J, *et al.* Type-III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infections. **J infect Dis** 2001;183:1767-74.
69. Jain M, Ramirez D, Seshadri R, Cullina JF, Powers CA, Schulert GS, *et al.* Type III secretion phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* strains change during infection of individuals with cystic fibrosis. **J Clin Microbiol** 2004;42:5229-37.

70. Mahenthiralingam E, Campbell ME, Henry DA, Speert DP. Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. **Infect Immun** 1994;62:596-605.
71. Cobb LM, Mychaleckyj JC, Wozniak DJ, Lopez-Boado YS. *Pseudomonas aeruginosa* flagellin and alginate elicit very distinct gene expression patterns in airway epithelial cells: implications for cystic fibrosis disease. **J Immunol** 2004;173:5659-70.
72. Hybiske K, Ichikawa JK, Huang V, Lory SJ, Machen TE. Cystic fibrosis airway epithelial cell polarity and bacterial flagellin determine host response to *Pseudomonas aeruginosa*. **Cell Microbiol** 2004;6:49-63.
73. Zhang Z, Louboutin PJ, Weiner DJ, Goldberg JB, Wilson JM. Human airway epithelial cells sense *Pseudomonas aeruginosa* infection via recognition of flagellin by Toll-like receptor 5. **Infect Immun** 2005;73:7151-60.
74. Luzar MA, Thomassen MJ, Montie TC. Flagella and motility alterations in *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with cystic fibrosis: relationship to clinical condition. **Infect Immun** 1985;50:577-82.
75. Head NE, Yu H. Cross-sectional analysis of clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: biofilm formation, virulence and genome diversity. **Infect Immun** 2004;72:133-44.
76. Taylor RF, Gaya H, Hodson ME, Pitt TL. Adult cystic fibrosis: association of acute pulmonary exacerbations and increasing severity of lung disease with auxotrophic mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. **Thorax** 1993;48:1002-5.
77. Thomas SR, Ray A, Hodson ME, Pitt TL. Increased sputum amino acid concentrations and auxotrophy of *Pseudomonas aeruginosa* in severe cystic fibrosis lung disease. **Thorax** 2000;55:795-7.
78. Schuster M, Greenberg EP. A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. **Int J Med Microbiol** 2006;296:73-81.
79. Schuster M, Lostroh CP, Ogi T, Greenberg EP. Identification, timing and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. **J Bacteriol** 2003;185:2066-79.

80. Wagner VE, Bushnell D, Passador L, Brooks AI, Iglewski BH. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. **J Bacteriol** 2003;185:2080-95.
81. Schaber JA, Carty NL, McDonald NA, Graham ED, Chelucappa R, Griswold JA, Hammond AN. Analysis of quorum-sensing deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **J Med Microbiol** 2004;53:841-53.
82. Girard G, Bloemberg GV. Central role of quorum-sensing in regulating the production of pathogenicity factors in *Pseudomonas aeruginosa*. **Fut Microbiol** 2008;3:97-106.
83. Hoboth C, Hoffman R, Eichner A, Henke C, Schmoldt S, Imhof A *et al.* Dynamics of adaptative microevolution of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* during chronic pulmonary infection in patients with cystic fibrosis. **J Infect Dis** 2009;200:118-30.
84. Jimenez PN, Koch G, Thompson J *et al.* The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. **MMBR** 2012;76(1):46-65.
85. Høiby N. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Diagnostic and prognostic significance of *Pseudomonas aeruginosa* precipitins determined by means of crossed immunoelectrophoresis. A survey. **APMIS** 1977;262:1-96.
86. Lee TWR, Brownlee KG, Conway SP, Denton M, Littlewood JM. Evaluation of a definition for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. **J Cyst Fibros** 2003;2(1):29-34.
87. Döring G, Høiby N. Longitudinal study of immune response to *P. aeruginosa* antigens in cystic fibrosis. **Infect Immun** 1983;42:197-201.
88. Pedersen S, Espersen F, Høiby N. Diagnosis for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis by enzyme-linked immunosorbent assay. **J Clin Microbiol** 1987;25(10):1830-6.
89. Formsgaard A, Høiby N, Shand GH, Conrad RS, Galanos C. Longitudinal study of antibody response to lipopolysaccharides during chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis. **Infect. Immun.** 1988;56(9):2270-8.
90. Brett MM, Ghoneim ATM, Littlewood JM. Serum antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. **Arch Dis Child** 1986;61:1114-20.

91. Burns JL, Gibson RL, McNamara S, Yim D, Emerson J, Rosenfeld M, *et al.* Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. **J infect Dis** 2001;183:444-52.
92. da Silva Filho LV, Tateno AF, Martins KM, Azzuz Chernishev AC, Garcia DO, Haug M, *et al.* The combination of PCR and serology increases the diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* colonization/infection in cystic fibrosis. **Pediatr Pulmonol.** 2007;42(10):938-44.
93. Weisner AM, Chart H, Bush A, Davies JC, Pitt TL. Detection of antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* in serum and oral fluid from patients with cystic fibrosis. **J Med Microbiol** 2007;56:670-74.
94. Doğru D, Peckan S, Yalçın E, Özçelik U, Kiper N, Gürcan N, Sener B. The role of serum *Pseudomonas aeruginosa* antibodies in the diagnosis and follow-up of cystic fibrosis. **Turk J Pediatr** 2013;55:50-7.
95. Brett MM, Ghoneim ATM, Littlewood JM. Prediction and diagnosis of early infection in cystic fibrosis: a follow-up study. **J Clin Microbiol** 1988;26:1565-70.
96. Kronborg G, Formsgaard A, Galanos C, Freudenberg MA, Høiby N. Antibody response to lipid A, core, and O sugars of the *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide in chronically infected cystic fibrosis patients. **J Clin Microbiol** 1992;30(7):1848-55.
97. Moss J, Ehrmantraut ME, Banwart BD, Frank DW, Barbieri JT. Sera from adult patients with cystic fibrosis contains antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* type III apparatus. **Infect Immun** 2001;69:1185-8.
98. Corech R, Rao A, Laxova A, Moss J, Rock MJ, Li Z, *et al.* Early immune response to the components of the type III system of *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis. **J Clin Microbiol** 2005;43:3956-62.
99. Weisner AM, Chart H, Bush A, Davies JC, Pitt TL. Detection of antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* in serum and oral fluid from patients with cystic fibrosis. **J Med Microbiol** 2007;56:670-74.
100. Cruz AC, Neves BC, Higa LYS. Type III apparatus of *Pseudomonas aeruginosa* as a tool to diagnose pulmonary infection in cystic fibrosis patients. **APMIS** 2012;120:622-7.

101. West SE, Zeng L, Lee BL, Kosorok MR, Laxova A, Rock MJ, *et al.* Respiratory infections with *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis: early detection by serology and assessment of risk factors. **JAMA** 2002;287:2958-67.
102. Pressler T, Karpati F, Granstrom M, Knudsen PK, Lindbald A, Hjelte L, *et al.* Scandinavian CF Study Consortium. Diagnostic significance of measurements of specific IgG antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* by three different serological methods. **J Cyst Fibros** 2009, (8):37-42.
103. Tramper-Stranders G.A, van der Ent CK, Sliker MG, Terheggen-Lagro SW, van Berkhout F, Kimpen JL, Wolfs TF. Diagnostic value of serological test against *Pseudomonas aeruginosa* in a large cystic fibrosis population. **Thorax** 2006, 61:689-693.
104. Hayes Jr. D, Farrell PM, Li Z, West SE. *Pseudomonas aeruginosa* serological analysis in young children with cystic fibrosis diagnosed through newborn screening. **Pediatr Pulmonol.** 2010;45(1):55-61.
105. Anstead M, Heltshe S, Khan U, Barbieri JT, Langkamp M, Döring G, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* serology and risk for re-isolation in the EPIC trial. **J Cyst Fibros** 2012;12(2):147-53.
106. Johansen HK, Norregaard L, Gotzsche PC, Pressler T, Koch C, Høiby N. Antibody response to *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients: a marker of therapeutic success? A 30-year cohort study of survival in danish of patients after onset of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. **Pediatr Pulmonol** 2004;37:427-32.
107. Ratjen F, Walter H, Haug M, Meisner C, Grasemann H, Döring G. Diagnostic value of serum antibodies in early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. **Pediatr Pulmonol** 2007;42:349-55.
108. Hollsing AE, Granström M, Vasil ML, Wretling B. Prospective study of serum antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* exoproteins in cystic fibrosis. **J Clin Microbiol** 1987;25:1868-74.
109. Mauch RM, Levy CE. Serum antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis as a diagnostic tool: a systematic review. **J Cyst Fibros** (2014).

110. Douglas TA, Brennan S, Berry L, Winfield K, Wainwright CE, Grinwood K, *et al.* Value of serology in predicting *Pseudomonas aeruginosa* infection in young children with cystic fibrosis. **Thorax** 2010;65(11):985-90.
111. De Boeck K, Derichs N, Fajac I, de Jonge HR, Bronsveld I, Sermet I, *et al.* New clinical diagnostic procedures for cystic fibrosis in Europe. **J Cyst Fibros** 2011;10(2):S53-S66.
112. Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR, *et al.* Guidelines for Diagnosis of Cystic Fibrosis in Newborns through Older Adults: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report. **J Pediatr** 2008;153(3):S4-S14.
113. Ooi CY, Dupuis A, Elis L, Jarvi K. Comparing the American and European diagnostic guidelines for cystic fibrosis: same disease, different language? **Thorax** 2012;67:618-24.
114. Gan SD, Patel KR. Enzyme Immunoassay and Enzyme-linked Immunosorbent Assay. **J Investig Dermatol** 2013;133,e12:1-3.
115. Hancock K, Tsang VCW. Development and optimization of the FAST-ELISA for detecting antibodies to *Schistosoma mansoni*. **J Immunol Methods** 1986;92:167-76.
116. Maddison SE. The present status of serodiagnosis and seroepidemiology of schistosomiasis. **Diagn Microbiol Infect Dis** 1987;7:93-105.
117. Fawcett T. An introduction to ROC analysis. **Patt Recognit Lett** 2006;861-74.
118. Kappler M, Kraxner A, Reinhardt D, Ganster B, Griesse M, Lang T. Diagnostic and prognostic value of serum antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. **Thorax** 2006;61:684-8.
119. Proesmans M, Balinska-Mizkiewicz W, Dupont L, Bossuyt X, Verhaegen J, Høiby N, *et al.* Evaluating the “Leeds criteria” for *Pseudomonas aeruginosa* infection in a cystic fibrosis centre. **Eur Resp J** 2006;27:937-43.
120. Milagres LG, Castro TL, Garcia D, Cruz AC, Higa L, Folescu T *et al.* Antibody response to *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis. **Pediatr Pulmonol.** 2009;44(4):392-401.
121. Equi AC, Pike SE, Davies J, Bush A. Use of cough swabs in a cystic fibrosis clinic. **Arch Dis Child.** 2001;85(5):438-9.

122. Goddard AF, Staudinger BJ, Dowd SE, Joshi-Datar A, Wolcott RD, Aitken ML, *et al.* Direct sampling of cystic fibrosis lungs indicates that DNA-based analyses of upper-airway specimens can misrepresent lung microbiota. **Proc Natl Acad Sci USA** 2012;109:13769-74.
123. Armstrong DS, Grinwood K, Carlin JB, Carzino R, Olinsky A, Phelan PD. Bronchoalveolar lavage or oropharyngeal cultures to identify lower respiratory pathogens in infants with cystic fibrosis. **Pediatr Pulmonol** 1996;21:267-75.
124. Høiby N. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Relationship between mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa* and the humoral response. **Acta Pathol Microbiol Scand [B] Microbiol Immunol** 1974(82);4:551-8.
125. Pressler T, Bohmova C, Conway S, Dumcius S, Hjelte L, Høiby N, *et al.* Chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection definition: EuroCareCF Working Group report. **J Cyst Fibros** 2011;10(2):S75-8.

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

O Sr. (ª) está sendo convidado(a) a participar do projeto Projeto de Pesquisa: **Monitoramento sorológico anti IgG de infecção por *Pseudomonas aeruginosa* em pacientes com fibrose cística atendidos no HC da UNICAMP** tendo como Pesquisador responsável: Prof.Dr.Carlos Emilio Levy do Depto Patologia Clínica FCM-UNICAMP

O Local do estudo: ambulatório de Fibrose Cística do Hospital das Clinicas da UNICAMP do Departamento de Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP

Nome do voluntário: _____

Idade: _____ anos R.G. _____

Responsável legal (quando for o caso): _____

R.G. Responsável legal: _____

Esclarecimento sobre as finalidades do estudo: Muitos pacientes com fibrose cística tem uma doença pulmonar caracterizada por secreções respiratórias espessas, infecções pulmonares agudas repetidas (pneumonias acompanhadas de febre e catarro), que se tornam crônicas piorando a respiração e a disposição para atividades físicas como correr, andar, etc.

A *Pseudomonas aeruginosa* é a bactéria de maior importância como agente de infecção pulmonar crônica na fibrose cística. O diagnóstico precoce da presença desta bactéria poderá ser realizado através de exames de sangue, como é feito nos principais centros de tratamento de pacientes com fibrose cística, antes que ela seja detectada na cultura do escarro.

O esclarecimento acima se deve ao fato de que necessitamos seu consentimento para que amostras de sangue sejam colhidas de rotina no acompanhamento semestral e em situações de piora de infecções pulmonares.

Estes exames de sorologia irão permitir o uso rápido de antibióticos específicos para procurar eliminar a bactéria *P. aeruginosa* das secreções e oferecer melhores condições clínicas aos pacientes .

A realização deste exame deverá ser rotina deste serviço, mas nesta fase inicial a participação dos pacientes esta sendo voluntária as amostras coletadas estocadas em congelador aguardando a aquisição dos reagentes e padronização da técnica.

Não há nenhuma contra-indicação para a realização do exame, como também não será oferecido nenhum tipo de compensação. Este exame é considerado um avanço em termos de recursos para otimizar o tratamento, mas a não realização do exame não implicará em qualquer prejuízo na atenção que o paciente receberá em nosso serviço. Qualquer anormalidade deverá ser comunicada pelo pesquisador ou orientador e a desistência de participar deste estudo poderá ocorrer a qualquer momento. Fica assegurado o sigilo das informações e resultados decorrentes deste estudo.

A coleta de sangue apresenta desconforto semelhante as demais coletas de sangue que rotineiramente os pacientes são submetidos, não oferecendo nenhum risco a mais. Uma cópia deste consentimento deverá ser fornecida ao paciente ou responsável quando da assinatura deste consentimento.

Eu, _____, RG nº _____
declaro ter sido informado e concordo em participar, como voluntário, do projeto de pesquisa acima descrito.

Ou

Eu, _____, RG _____ nº _____
_____,

responsável legal por _____, RG
nº _____

declaro ter sido informado e concordo com a sua participação, como voluntário, no projeto de pesquisa acima descrito.

Campinas, _____ de _____ de _____

Em caso de dúvida ou qualquer outro motivo relacionado a esta coleta de sangue ou exame de sorologia para detecção de anticorpos contra *Pseudomonas aeruginosa* contatar:

Renan Marrichi Mauch: (19) 3521-7064 ou 3521-7435. Celular: (19) 9252-9717. E-mail: renanm@fcm.unicamp.br

- **Prof. Dr. Carlos Emilio Levy:** Departamento de Patologia Clínica FCM-UNICAMP; (19) 3521-7557 ou 9175-3563. E-mail: celevy@fcm.unicamp.br
- **Comitê de Ética em Pesquisa:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 - Caixa Postal 6111; CEP 13083-887, Campinas – SP
Fone (019) 3521-8936. Fax (019) 3521-7187. E-mail: cep@fcm.unicamp.br

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

O Sr. ^(a) está sendo convidado(a) a participar do Projeto de Pesquisa: **Monitoramento sorológico anti-IgG da infecção por *Pseudomonas aeruginosa* em pacientes com fibrose cística atendidos no HC-Unicamp**, tendo como Pesquisador responsável o Biomédico e aluno de pós graduação **Renan Marrichi Mauch** e o **Prof. Dr. Carlos Emilio Levy** do Depto Patologia Clínica FCM-UNICAMP

Local do estudo: Hospital das Clínicas da UNICAMP; Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP

Esclarecimento sobre as finalidades do estudo: Muitos pacientes com fibrose cística possuem uma doença pulmonar caracterizada por secreções respiratórias espessas e infecções pulmonares repetidas, sendo a *Pseudomonas aeruginosa* a bactéria de maior importância como agente de infecção pulmonar crônica. A detecção precoce desta bactéria poderá ser realizada por meio de um exame de sangue denominado sorologia para detecção de anticorpos anti-*Pseudomonas aeruginosa*.

O esclarecimento acima se deve ao fato de que necessitamos de seu consentimento para que uma amostra de sangue seja colhida de seu filho (a) quando forem colhidas amostras de sangue para exames de rotina de pré-operatório durante esta internação.

Como seu filho não possui esta doença, a amostra de sangue será usada para padronização da técnica sorológica, onde iremos comparar seus níveis de anticorpos com os de pacientes infectados pela bactéria mencionada. Estes exames de sorologia irão permitir o uso rápido de antibióticos específicos para procurar eliminar a bactéria *P. aeruginosa* das secreções e oferecer melhores condições clínicas aos pacientes com fibrose cística.

Não há nenhuma contraindicação para a realização do exame, como também não será oferecido nenhum tipo de compensação e seu filho não terá nenhum proveito deste exame. A não realização do exame não implicará em qualquer prejuízo na atenção que o paciente receberá em nosso serviço.

A coleta de sangue apresenta desconforto semelhante às demais coletas de sangue às quais rotineiramente os pacientes são submetidos, não oferecendo nenhum risco a mais, e deverá ser feita em uma única vez, quando exames de rotina forem solicitados. Uma cópia deste consentimento deverá ser fornecida ao paciente ou responsável quando da assinatura deste consentimento.

Nome do voluntário: _____

Idade: _____ anos R.G. _____

Responsável: _____

R.G. do Responsável legal: _____

Declaro ter sido informado e concordo com a sua participação, como voluntário, no projeto de pesquisa acima descrito.

Campinas, ____ de _____ de 2013

Em caso de dúvida ou qualquer outro motivo relacionado a esta coleta de sangue, contactar:

- **Renan Marrichi Mauch:** (19) 3521-7064 ou 3521-7435. Celular: (19) 9252-9717. E-mail: renanm@fcm.unicamp.br
- **Prof. Dr. Carlos Emilio Levy:** Departamento de Patologia Clínica FCM-UNICAMP; (19) 3521-7557 ou 9175-3563. E-mail: celevy@fcm.unicamp.br
- **Comitê de Ética em Pesquisa:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 - Caixa Postal 6111; CEP 13083-887, Campinas – SP
Fone (019) 3521-8936. Fax (019) 3521-7187. E-mail: cep@fcm.unicamp.br