

## **Il monitoraggio immunologico dell'infezione da *Pseudomonas aeruginosa***

Novella Ravenni  
Centro Regionale Toscano Fibrosi Cistica  
Dipartimento di Pediatria  
A. O. Meyer  
n.ravenni@meyer.it

### **Introduzione**

La maggior parte dei pazienti affetti da Fibrosi Cistica (FC) soffre di infezioni ricorrenti e croniche localizzate nel tratto respiratorio inferiore, che risulta così esposto ad una forte e sostenuta stimolazione antigenica, per cui l'ipergammaglobulinemia è una caratteristica comune in FC. Tale aspetto è particolarmente pronunciato nei pazienti con colonizzazione cronica da *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*).

In una patologia cronica come la FC il sistema immunitario è inefficace nel conservare le vie aeree libere da batteri; dal momento che però esso mantiene la fisiologica capacità di reagire verso i vari microrganismi che colonizzano le vie respiratorie, la malattia infettiva cronica diventa anche una malattia infiammatoria cronica. L'infiammazione cronica e suoi prodotti solubili, così come hanno effetti benefici nel raggiungimento dell'equilibrio ospite-parassita, possono essere anche pericolosi e, nel contesto dell'FC, contribuire alla patologia polmonare: prodotti infiammatori sono infatti costantemente presenti nelle vie aeree FC ed hanno il potenziale per danneggiare non soltanto le cellule delle vie respiratorie ma anche cellule dell'infiltrato infiammatorio. Le cause di tale danno sono principalmente:

- un massivo afflusso di neutrofili nelle vie aeree con aumento del rilascio di fattori danneggianti l'epitelio (es. elastasi)
- una reazione infiammatoria secondaria alla formazione di immunocomplessi circolanti, con manifestazioni cliniche mediate da precipitazione degli immunocomplessi stessi (es. artropatie, artriti e vasculiti cutanee leucocitoclastiche)
- una produzione di anticorpi che ostacolano il processo di opsonizzazione, rappresentando così un ostacolo alla fagocitosi

Nel caso dell'infezione polmonare sostenuta da *P. aeruginosa*, il risultato della risposta umorale si traduce in un aumento della produzione di anticorpi diretti verso il batterio, che però non viene eliminato; si determina quindi una ipergammaglobulinemia (soprattutto in pazienti cronici) (Hassan *et al.*, 1994) in cui tali anticorpi non conferiscono alcuna protezione, ma sono anzi associati ad una progressiva riduzione della funzionalità polmonare.

In FC si ipotizza quindi una disregolazione della risposta immunitaria che risulta così fondamentale nel perpetuare uno stato infiammatorio cronico, per cui possiamo concludere che il danno polmonare non sia causato soltanto dal batterio in sé ma anche da una risposta immunomediata, a causa di una esagerata risposta infiammatoria verso *P. aeruginosa*; per tale motivo elevati titoli anticorpali possono essere considerati un marker di prognosi infausta.

Gli anticorpi prodotti verso *P. aeruginosa* si sviluppano secondo una precisa gerarchia temporale, che potrebbe riflettere la sequenziale produzione dei diversi antigeni del batterio durante lo stabilirsi dell'infezione polmonare (West *et al.*, 2002): in particolare è stato osservato che gli anticorpi anti-esotossina A e anti-fosfolipasi C sembrano svilupparsi per primi, mentre per la produzione di anticorpi anti-elastasi e anti-proteasi alcalina è necessario un tempo maggiore (Tramper-Stranders *et al.*, 2005). I titoli anticorpali aumentano durante i periodi di infezione attiva, mentre ne è stata osservata una diminuzione durante il trattamento antibiotico (Tramper-Stranders *et al.*, 2005).

Sembra inoltre che la fase assenza/ presenza del batterio e la transizione ceppi non mucoidi/ceppi mucoidi portino ad un incremento dei titoli anticorpali, suggerendo che la risposta umorale sia strettamente correlata ai vari stadi di colonizzazione del batterio (Zhanhai *et al.*, 2006). La memoria della risposta anticorpale, specializzata nella difesa da *P. aeruginosa*, viene potenziata dalle ricorrenti infezioni da parte del batterio. Durante l'infezione con ceppi non mucoidi, i linfociti B riconoscono la presenza del germe e aumentano la produzione di anticorpi: per tale motivo i pazienti FC sviluppano una immediata ma moderata risposta immunitaria verso tali ceppi. Con la transizione al fenotipo mucoide la produzione Ab è

ulteriormente potenziata (Zhanhai *et al.*, 2006). L'aumento quindi dei titoli anticorpali possono rappresentare precoci segnali delle varie fasi di colonizzazione da parte di *P. aeruginosa*.

### **IgG e sottoclassi**

I pazienti FC con infezione cronica da *P. aeruginosa* producono elevati livelli di specifici anticorpi diretti verso la maggior parte dei costituenti antigenici batterici, in particolare verso gli antigeni di superficie, incluso lipopolisaccaride e alginato (Pressler *et al.*, 1994) e verso i principali fattori di virulenza, cioè proteinasi alcalina, elastasi e esotossina A.

E' stato ampiamente dimostrato che le IgG prodotte da pazienti FC in risposta all'infezione da *P. aeruginosa* sono inefficaci nel mediare l'opsonizzazione e il killing del batterio (Pressler *et al.*, 1994); dal momento che il legame delle IgG anti-LPS è normale, è stato ipotizzato che tale inibizione sia dovuta ad un effetto inibitorio mediato dalla porzione Fc dell'anticorpo.

Esistono 4 sottoclassi di IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) con diversa struttura, funzione e coinvolgimento nella risposta anticorpale: esse hanno infatti una diversa abilità nel promuovere il processo di fagocitosi, nell'attivazione del complemento e nel ruolo protettivo verso batteri. I pazienti cronici rispondono principalmente con produzione IgG1, IgG2 e IgG3 (Pressler, 1995): infatti *P. aeruginosa* stimola preferenzialmente la produzione di IgG2 e IgG3, ed elevati livelli di IgG2 e IgG3 riflettono un'infezione più aggressiva, che porta ad una maggiore compromissione polmonare (Pressler, 1996; Likavcanova *et al.*, 1992); è stato inoltre ipotizzato che elevati livelli di IgG3 possano contribuire al danno polmonare.

Probabilmente è per tale motivo che alcuni pazienti colonizzati da *P. aeruginosa* rimangono clinicamente stabili a lungo mentre altri peggiorano rapidamente (Likavcanova, 1992).

Nell'infezione cronica sono stati trovati anche elevati titoli di IgG4, anche se più bassi rispetto alle altre sottoclassi; tali anticorpi sono funzionalmente monovalenti e quindi danno luogo a piccoli complessi immuni non precipitanti che, non fissando il complemento, potrebbero in qualche modo ridurre la patologia mediata dal complemento stesso, aiutando così a conservare la funzionalità polmonare (Likavcanova *et al.*, 1992). Le varie sottoclassi di IgG forniscono quindi un ausilio nel monitoraggio della malattia polmonare.

L'infezione da *P. aeruginosa* coinvolge sostanze responsabili dei processi di aderenza, colonizzazione o invasione durante fase precoce di infezione, tra questi il flagello di *P. aeruginosa* che rappresenta quindi un fattore di virulenza: è presente un singolo flagello polare costituito da 2 subunità, 2 flagelline denominate "a" e "b" in base al loro diverso peso molecolare. Tali antigeni flagellari hanno una rilevanza clinica perché sono stati trovati nel 98% dei ceppi motili in uno studio di 300 isolati clinici (Lagace *et al.*, 1995). Elevati valori di IgG anti-flagellina "a" e "b" sono stati trovati sia in pazienti con infezione intermittente che cronica. La produzione di IgG1 e IgG3 verso la flagellina di tipo "b" è significativamente diversa tra pazienti con buona e cattiva funzionalità polmonare in quanto elevati livelli di tali sottoclassi di anticorpi sono correlati a scarsa funzionalità polmonare (Lagace *et al.*, 1995). Inoltre nel polmone FC elevati titoli di IgG1 e IgG3 possono incrementare l'attivazione del complemento, con conseguente produzione di anafilotossine (C3a, C4a, C5a) che potenziando la chemiotassi dei neutrofili contribuiscono all'infiammazione polmonare, al danno tissutale mediato dal complemento e al peggioramento della funzionalità polmonare (Lagace *et al.*, 1995).

### **IgA**

Negli stadi precoci dell'infezione polmonare da *P. aeruginosa* la mucosa del tratto respiratorio è il primo sito di colonizzazione. Le IgA in questa sede hanno il compito di agglutinare i batteri, prevenirne l'adesione alle cellule epiteliali respiratorie, diminuirne la velocità di crescita, neutralizzare le esotossine ma non risultano efficaci nel processo di opsonizzazione batterica: quando la risposta umorale sostenuta dalle IgA è inadeguata nel prevenire la crescita batterica e l'adesione alla mucosa polmonare, si ha la produzione di IgG.

Il ruolo delle IgA e l'associazione tra concentrazione di IgA nel siero e progressione della malattia non sono del tutto note (Brett *et al.*, 1988). Dal momento che le IgA rappresentano l'iniziale risposta anticorpale nei confronti di una colonizzazione batterica a livello polmonare, è possibile che al momento dell'insorgenza della colonizzazione un incremento di IgA specifiche nel siero avvenga prima di un incremento delle specifiche IgG (Brett *et al.*, 1988): elevati titoli di IgA in assenza di IgG potrebbero essere indice di sola colonizzazione, senza invasione di

tessuti e senza infezione, e ciò potrebbe quindi rivelarsi di particolare rilevanza per il trattamento antibiotico di pazienti nelle prime fasi di colonizzazione, quando è ancora possibile l'eradicazione del batterio (Brett *et al.*, 1990). E' noto che nell'infezione del tratto respiratorio superiore predominano le IgA, mentre in quelle del tratto inferiore predominano le IgG e dal momento che entrambe sono coinvolte nella risposta immunitaria verso *P. aeruginosa*, un confronto tra i titoli di IgA e di IgG potrebbe fornire indicazioni sulla profondità dell'infezione. Il rapporto dei titoli IgA:IgG diminuisce con il progredire dell'infezione, così che pazienti con colonizzazione intermittente hanno un rapporto dei titoli più elevato rispetto a pazienti colonizzati in modo cronico (Brett *et al.*, 1990); la presenza di un rapporto di titoli elevato potrebbe essere indicativo di una risposta immune basata prevalentemente sulle IgA, che risultando sufficienti nel prevenire l'invasione tissutale e così che non c'è stimolo per la produzione di IgG.

Dopo trattamento eradicante avvenuto con successo, *P. aeruginosa* può essere nuovamente isolata nello stesso paziente, e sembra che la misura del titolo delle IgA possa rivelarsi migliore rispetto a quella delle IgG nel predire la presenza di nuova infezione, dal momento che si hanno elevati titoli di IgA prima della comparsa del batterio nell'esame colturale (Brett *et al.*, 1990). Il 90% dei pazienti FC produce infatti IgA prima che *P. aeruginosa* sia presente in carica sufficiente ( $10^4$ - $10^5$  CFU/ml) da essere isolata nel campione respiratorio anche se tale risposta anticorpale non previene comunque lo stabilirsi dell'infezione (Brett *et al.*, 1990); un'analisi periodica dei sieri per la ricerca di IgA anti-esotossina A, elastasi e proteasi alcalina potrebbe quindi rivelarsi utile per sospettare presenza di *P. aeruginosa* prima del suo isolamento colturale (Kappler *et al.*, 2006). Non essendo ancora stato però stabilito il reale valore diagnostico delle IgA, anche in presenza di un aumento dei titoli anticorpali, non viene somministrata alcuna terapia antibiotica se l'esame colturale risulta negativo.

La ricerca delle IgA, e delle IgG, viene eseguita tramite Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA): è un metodo immunoenzimatico dotato di buona specificità e sensibilità utilizzato per la ricerca di anticorpi diretti contro specifici antigeni. Gli antigeni utilizzati possono essere diversi: fattori di virulenza (elastasi, proteasi alcalina e esotossina A) o lipopolisaccaride (Brett *et al.*, 1988; Fomsgaard *et al.*, 1989). Da un'analisi dei titoli anticorpali verso gli antigeni di superficie di *P. aeruginosa* nel siero eseguita tramite tale metodica, per le IgA è stato rilevato un pattern simile a quello seguito dalle IgG: i pazienti non colonizzati hanno titoli di IgA molto bassi, i pazienti con colonizzazione intermittente hanno titoli elevati mentre quelli con colonizzazione cronica hanno titoli ancora maggiori (Brett *et al.*, 1990). Per quanto riguarda le sottoclassi di IgA, Hassan *et al.* hanno osservato una significativa riduzione dei livelli di IgA1 post trattamento, mentre in contrasto, un aumento, anche se non statisticamente significativo, dei livelli di IgA2: in seguito a trattamento antibiotico quindi i livelli di IgA1, suscettibili alle proteasi batteriche, sembrano diminuire, con un concomitante incremento dei titoli della sottoclasse IgA2, resistenti alle proteasi (Hassan *et al.*, 1994).

In conclusione la misura delle IgA potrebbe migliorare il management dei pazienti in 2 casi:

- come indicatori più precoci, rispetto alle IgG, di presenza di *P. aeruginosa* nel tratto respiratorio nei primi stadi della prima colonizzazione (Brett *et al.*, 1990)
- per predire la ricomparsa di *P. aeruginosa* nelle colonizzazioni successive al trattamento antibiotico eradicante

### **Tecniche usate nella diagnostica sierologica**

Sono stati messi a punto vari saggi per determinare i livelli di anticorpi diretti verso i principali antigeni di *P. aeruginosa* (lipopolisaccaride, esotossina A, elastasi e proteasi alcalina); attualmente però nessuna tecnica è dotata di specificità e sensibilità tali da rappresentare il metodo di riferimento per il monitoraggio di infezioni polmonari.

I valori sierologici possono variare in base al momento della colonizzazione in cui vengono ricercati gli anticorpi, sia in base alla tecnica e che al tipo di antigene usati. Gli anticorpi verso *P. aeruginosa* mostrano differenti trend di aumento durante l'infezione ed esiste una gerarchia temporale nello sviluppo di tali anticorpi: gli anticorpi anti-esotossina A e anti-fosfolipasi C sembrano svilupparsi per primi, mentre è necessario un periodo di tempo maggiore perché si abbia un aumento dei titoli anticorpali anti-elastasi e anti-proteasi alcalina (Tramper-Stranders *et al.*, 2005). Esistono anche diversi fattori che possono influenzare lo sviluppo di una risposta umorale, come ceppi di *P. aeruginosa* con fenotipo mucoside che sembrano indurre

una risposta anticorpale più pronunciata rispetto a quella evocata da ceppi con fenotipo non mucoide (Brett *et al.*, 1986; Brett *et al.*, 1992).

-Risposta anticorpale nell'infezione cronica da *P. aeruginosa*: La maggior parte dei test diagnostici sierologici sono basati sulla ricerca delle IgG e pazienti colonizzati in modo cronico mostrano elevati titoli; la sensibilità e la specificità della sierologia nella colonizzazione cronica differisce sensibilmente in base ai vari metodi e ai vari antigeni usati.

La metodica utilizzata per la ricerca degli anticorpi precipitanti anti-*P. aeruginosa* è l'immuno-elettroforesi crociata (CIE), in cui si ricercano anticorpi diretti verso un antigene sonificato dei principali sierotipi di *P. aeruginosa* fornito dal Danish Cystic Fibrosis Center (Hoiby, 1977; Hoiby *et al.*, 1983); in tale metodica, sfruttando la doppia diffusione in gel che consente di identificare sia l'antigene che l'anticorpo, là dove si ha l'incontro antigene-anticorpo, si forma un picco di precipitazione. È una tecnica dotata di buon potere analitico anche se di scarsa sensibilità, non è costosa ma laboriosa, e analizza solo un numero limitato di campioni; evidenzia solo anticorpi precipitanti e non ricerca anticorpi diretti contro antigeni specifici.

Dopo la prima coltura positiva per *P. aeruginosa*, gli anticorpi precipitanti (precipitine) vengono ricercate 2 volte all'anno. Quando il numero dei picchi di precipitine è maggiore o uguale a 2, si parla di colonizzazione cronica. Dall'analisi di tre gruppi di pazienti (cronici, intermittenti e non colonizzati) è stato osservato che il numero di precipitine risulta significativamente più alto nei pazienti con colonizzazione cronica ( $13.55 \pm 9.1$ ) rispetto ai pazienti intermittenti ( $0.16 \pm 0.11$ ) o non colonizzati dal germe ( $0.16 \pm 0.08$ ) (Marianelli *et al.*, 1994).

È ormai risaputo che esiste una correlazione inversa tra il numero delle precipitine e la compromissione polmonare e che nei pazienti cronici è presente un incremento del numero dei picchi di precipitine nel tempo: in base all'esperienza in letteratura, nei pazienti cronici sottoposti a cicli antibiotici trimestrali somministrati per via endovenosa, si assiste ad un incremento di 2.5 picchi per anno, mentre in quelli non sottoposti a tale tipo di terapia l'incremento è più alto (5 picchi di precipitine per anno) (Hoiby, 1977). In accordo con l'esperienza internazionale, nel Centro FC di Firenze, in regolare trattamento antibiotico per via endovenosa, l'incremento annuo medio di precipitine è risultato di 3.7 picchi (Marianelli *et al.*, 1994, Chiappini *et al.*, 2001).

In conclusione variazioni del numero di precipitine nel siero potrebbero rappresentare un buon marker per iniziare un trattamento antibiotico verso *P. aeruginosa* più tempestivo, che consentirebbe di prolungare quindi il periodo tra colonizzazione e infezione cronica (Trancassini *et al.*, 1996).

I valori di IgG anti-proteine batteriche totali ottenuti tramite ELISA correlano con i livelli di precipitine ricercati tramite CIE e tali metodiche mostrano una sensibilità tra il 96 e il 100% per la valutazione di colonizzazione cronica da *P. aeruginosa* (Pedersen *et al.*, 1987); la tecnica ELISA basata su un singolo antigene purificato mostra invece una sensibilità più bassa per la conferma della cronicità e risulta antigene-dipendente (Hollsing *et al.*, 1987).

autore	Test	sensibilità (%)
<b>Granstrom, 1984</b>	ELISA	
	- esotossina A	68
	- proteasi alcalina	73
	- elastasi	23
<b>Hollsing, 1987</b>	ELISA	
	- esotossina A	58
	- proteasi alcalina	58
	- elastasi	15
<b>Pedersen, 1987</b>	ELISA (proteine cellulari totali)	96
	CIE (Ab precipitanti)	100

Sensibilità di ELISA e CIE per la ricerca di IgG verso diversi antigeni di *P. aeruginosa* in pazienti con colonizzazione cronica (Tramper-Stranders *et al.*, 2005)

Nello studio di Campana *et al.*, gli anticorpi precipitanti ricercati tramite CIE e gli anticorpi diretti verso i principali fattori di virulenza (elastasi, proteasi alcalina, esotossina A) del

batterio ricercati tramite ELISA rappresentano un buon marker di infezione polmonare cronica in quanto entrambi i metodi hanno una specificità e un valore predittivo positivo del 100%, ma dall'altra parte la sensibilità dei due test è risultata piuttosto bassa (78% e 52% rispettivamente). Il test ELISA effettuato per la ricerca di IgA e IgG anti-lipopolisaccaride ha mostrato elevata sensibilità (96%) sia per le IgA che per le IgG, ma le IgA, a causa della bassa specificità (38%), non possono essere usate per la diagnosi di cronicità (Campana *et al.*, 2005).

-Risposta anticorpale nell'infezione intermittente da *P. aeruginosa*: da studi longitudinali è noto che elevati titoli anticorpali non sono osservati solo nell'infezione cronica, ma anche negli stati precoci dell'infezione: la colonizzazione intermittente può infatti potenziare la formazione di anticorpi specifici, la cui concentrazione però, se confrontata con quella di pazienti colonizzati in modo cronico, risulta comunque più bassa. I titoli anticorpali, essendo influenzati anche dal trattamento antibiotico, possono variare: aumentano infatti durante l'infezione attiva, ma in seguito a trattamento antibiotico ne è stato evidenziato un decremento (Tramper-Stranders *et al.*, 2005).

-Risposta anticorpale in pazienti con infezione precoce da *P. aeruginosa*: La mancanza di un metodo di riferimento per la diagnosi di infezione precoce da *P. aeruginosa* pone l'attenzione sulla possibilità di utilizzo di specifici anticorpi come test aggiuntivo, che consentano quindi di effettuare un trattamento antibiotico più tempestivo. La seguente tabella mostra vari studi in cui sono presenti elevati titoli anticorpali anti-*P. aeruginosa* in pazienti con esame colturale negativo.

Autore	Test	% Ab
Brett, 1988	ELISA (proteine cellulari totali)	73
Burns, 2001	ELISA esotossina A	36
West, 2002	ELISA - esotossina A	69
	- lisato cellulare	88
	- elastasi	44

Percentuale di anticorpi anti-*P. aeruginosa* in pazienti con esame colturale negativo (Tramper-Stranders *et al.*, 2005).

I tre lavori di Brett, Burns e West mostrano la presenza di una precoce risposta anticorpale verso *P. aeruginosa* in assenza del germe nell'esame colturale del campione respiratorio, indicando che gli studi sierologici dimostrano una più elevata incidenza di infezione rispetto all'esame colturale stesso; in particolare Burns *et al.* rilevano che la comparsa per la prima volta di anticorpi anti-esotossina A e anti-proteine cellulari totali precede la prima identificazione di *P. aeruginosa* nel campione respiratorio (Tramper-Stranders *et al.*, 2005). È stato visto che un incremento di anticorpi anti-*P. aeruginosa* si può verificare anche 6-12 mesi prima che il germe venga isolato nel campione respiratorio; in generale lo sviluppo di anticorpi prima dell'isolamento del batterio si è manifestata approssimativamente nel 50-70% dei pazienti e come tale una coltura negativa non può definitivamente escludere la presenza di *P. aeruginosa* nel tratto respiratorio (Brett *et al.*, 1988; West *et al.*, 2002).

Recentemente Ratjen *et al.* hanno valutato i titoli di anticorpi diretto verso i principali fattori di virulenza di *P. aeruginosa* (proteasi alcalina, esotossina A e elastasi) tramite tecnica ELISA: alla specificità del 97.5%, il test ha mostrato la sensibilità più elevata per la ricerca di anticorpi anti-proteasi alcalina (85.4%), seguita da quella per anticorpi anti-elastasi (76.2%) e anti-esotossina A (72%). In base a cut-off di nuova definizione, titoli anticorpali positivi verso almeno uno dei tre diversi antigeni erano presenti nel 43% dei pazienti con nuova infezione da *P. aeruginosa*. Saggi longitudinali di titolazione anticorpale eseguiti prima e dopo terapia antibiotica eradicante al momento del primo isolamento del germe hanno mostrato una significativa diminuzione delle concentrazioni di anticorpi anti-proteasi alcalina e anti-esotossina A in pazienti eradicati, mentre un aumento nei casi di fallimento del trattamento

eradicante (Ratjen *et al.*, 2007). In questo studio quindi il test ELISA per la ricerca di anticorpi verso elastasi, proteasi alcalina e esotossina A ha rivelato alta sensibilità e specificità per la diagnosi di infezione precoce da *P. aeruginosa*; la sensibilità della metodica nel caso di utilizzo combinato dei tre antigeni si è rivelata comunque più elevata rispetto a quella fornita da ogni singolo antigene da solo (Ratjen *et al.*, 2007), suggerendo che l'utilizzo simultaneo di tre test ELISA ha sensibilità superiore a quella in cui viene usato un singolo ELISA.

### **Uso diagnostico della risposta immunitaria: conclusioni**

Il dosaggio degli anticorpi è attualmente utilizzato per dimostrare la presenza di colonizzazione cronica da *P. aeruginosa*: infatti le IgG consentono una distinzione tra colonizzazione intermittente (isolamento continuo di *P. aeruginosa* nelle vie respiratorie per un periodo tempo inferiore a 6 mesi e normali livelli di anticorpi (Hoiby *et al.*, 2005) e cronica (isolamento di *P. aeruginosa* dalle vie aeree per almeno 6 mesi e/o livelli Ab superiori al valore di cut-off (Cystic Fibrosis Foundation 1998).

L'infezione da *P. aeruginosa* in FC è generalmente diagnosticata tramite esame colturale del campione respiratorio, cioè dell'escreato e del tampone faringeo nel caso di pazienti piccoli o non espettoranti: l'esame colturale rappresenta quindi il test di riferimento per identificare la colonizzazione da *P. aeruginosa*. Tale esame può però non essere sempre sufficiente per valutare la presenza del germe perché potrebbe fornire esiti falsamente negativi, per mancata crescita a causa della pressione antibiotica o per bassa carica microbica, o quando il campione respiratorio è rappresentato dal tampone faringeo; tale tipo di campione non fornisce infatti un quadro esatto della flora batterica del tratto respiratorio inferiore ed ha un più basso valore predittivo positivo e negativo se confrontato con l'escreato o il lavaggio broncoalveolare, quest'ultimo comunque di non utilizzo routinario. Anche in caso di esame colturale positivo potremmo avere difficoltà nell'isolamento del batterio, per esempio per bassa carica e/o coltura mista, o nella distinzione tra colonizzazione e infezione. In tutte queste situazioni in cui l'esame colturale da solo non è sufficiente, la diagnosi sierologica rappresenta un fondamentale e addizionale marker per poter escludere o confermare definitivamente la presenza del batterio e per definire lo stato di colonizzazione/infezione in pazienti FC.

Data l'assenza di un test specifico per la diagnosi di infezione precoce da *P. aeruginosa*, gli anticorpi potrebbero rivelarsi utili anche per identificare il primo isolamento del germe e per poter attuare un trattamento farmacologico più tempestivo che potrebbe prolungare il periodo tra colonizzazione e infezione cronica: recenti studi mostrano che il 50-70% dei pazienti sviluppa IgA prima dell'isolamento di *P. aeruginosa* nel campione respiratorio, per cui le IgA potrebbero rappresentare un marker di infezione precoce, sia nella prima colonizzazione che in quelle successive al trattamento eradicante, e quindi consentire una precoce terapia antibiotica. Questo permetterebbe una diagnosi di infezione anche 6-12 mesi prima dell'isolamento del microrganismo nel campione respiratorio. La diagnosi sierologica potrebbe rivelarsi utile anche per valutare l'efficacia del trattamento farmacologico: infatti i titoli anticorpali diminuiscono significativamente in pazienti sottoposti a trattamento antibiotico, mentre aumentano in quei casi che non rispondono alla terapia. I test immunologici individuano quindi la variazione del titolo anticorpale e la diversa risposta anticorpale in pazienti intermittenti e cronici durante trattamento antibiotico, fornendo informazioni sulla progressione della malattia e quindi mostrando l'efficacia della terapia prima che il miglioramento clinico sia evidente.

Ancora non è stato però stabilito il reale valore diagnostico delle IgA, per cui attualmente, anche in presenza di un aumento dei titoli anticorpali, non viene somministrata alcuna terapia antibiotica se l'esame colturale del campione respiratorio è negativo; la presenza di elevati valori di IgA potrebbe comunque costituire un campanello di allarme per il clinico. Uno screening periodico dei sieri per la ricerca di IgA anti-esotossina A, elastasi e proteasi alcalina e anti-lipopolisaccaride potrebbe quindi fornire informazioni sulla presenza presintomatica di *P. aeruginosa*, sia per quanto riguarda la prima colonizzazione che per predire la ricomparsa del germe nelle colonizzazioni successive al trattamento antibiotico eradicante. Come tali le IgA si rivelerebbero degli indicatori più precoci, rispetto alle IgG, di presenza di *P. aeruginosa* nel tratto respiratorio nei primi stadi della colonizzazione.

La metodica maggiormente utilizzata sia per la ricerca di IgG e di IgA è la tecnica ELISA; sono ancora in corso studi per determinare quale sia l'antigene migliore da utilizzare nei test, ma

attualmente nessun singolo antigene ha dato risultati ottimali. Dal momento però che i valori del test variano a seconda dell'antigene utilizzato, sarebbe importante l'uso di un antigene standardizzato che desse risultati affidabili, riproducibili e compatibili tra vari laboratori. Recentemente è stato dimostrato che la sensibilità della metodica ELISA, nel caso di utilizzo combinato dei tre fattori di virulenza come antigeni (elastasi, esotossina A, proteasi alcalina) si è rivelata più elevata rispetto a quella fornita da ogni singolo antigene da solo, suggerendo che l'utilizzo simultaneo di tre test ELISA ha sensibilità superiore a quella in cui viene usato un singolo ELISA. Nonostante questo, la variabilità dei risultati sierologici ottenuti tra i diversi quadri di colonizzazione cronica/intermittente e di non colonizzazione tra i pazienti FC rimane considerevole, per cui le decisioni riguardo al trattamento antibiotico non dovrebbero essere basate sui soli dati sierologici.

## **Bibliografia**

Brett MM, Ghoneim AT, Littlewood JM. Prediction and diagnosis of early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: a follow-up study. J Clin Microbiol. 1988 Aug;26(8):1565-70.

Brett MM, Ghoneim AT, Littlewood JM. Serum antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. Arch Dis Child. 1986 Nov;61(11):1114-20.

Brett MM, Ghoneim AT, Littlewood JM. Serum IgA antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. Arch Dis Child. 1990 Mar;65(3):259-63.

Brett MM, Simmonds EJ, Ghoneim AT, Littlewood JM. The value of serum IgG titres against *Pseudomonas aeruginosa* in the management of early pseudomonal infection in cystic fibrosis. Arch Dis Child. 1992 Sep;67(9):1086-8.

Campana S, Cariani L, Ravenni N, Garlaschi ML, Laricchia L, Costantini D, Taccetti G. Immunological diagnosis of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis patients: a comparison of methods. J Cystic Fibrosis 2005; (4) suppl 1:154.

Chiappini E, Taccetti G, Campana S, Turchini S, Marianelli L. Anti-*Pseudomonas aeruginosa* antibodies, circulating immune complexes, and anticytoplasm antibodies of neutrophils in patients with cystic fibrosis with and without *Pseudomonas aeruginosa* colonization. Pediatr Med Chir. 2001 Jan-Feb;23(1):27-30.

Cystic Fibrosis Foundation. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry 1997 Annual Data report. Bethesda, MD, USA. Cystic Fibrosis Foundation 1998.

Hassan J, Feighery C, Bresnihan B, Keogan M, Fitzgerald MX, Whelan A. Serum IgA and IgG subclasses during treatment for acute respiratory exacerbation in cystic fibrosis: analysis of patients colonised with mucoid or non-mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Immunol Invest. 1994 Jan;23(1):1-13.

Fomsgaard A, Dinesen B, Shand GH, Pressler T, Høiby N. Antilipopolysaccharide antibodies and differential diagnosis of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 1989 Jun;27(6):1222-9.

Hoiby N. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Diagnostic and prognostic significance of *Pseudomonas aeruginosa* precipitins determined by means of crossed immunoelectrophoresis. A survey. Acta Pathol Microbiol Scand Suppl. 1977;(262):1-96.

Hoiby N, Axelsen NH. Handbook of immunoprecipitation-in-gel Techniques. Scand J Immunol Suppl. 1983;10:1-383.

Høiby N, Frederiksen B, Pressler T. Eradication of early *Pseudomonas aeruginosa* infection. J Cyst Fibros. 2005 Aug;4 Suppl 2:49-54.

Hollings AE, Granström M, Vasil ML, Wretling B, Strandvik B. Prospective study of serum antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* exoproteins in cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 1987 Oct;25(10):1868-74.

Kappler M, Kraxner A, Reinhardt D, Ganster B, Griese M, Lang T. Diagnostic and prognostic value of serum antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. Thorax. 2006 Aug;61(8):684-8. Epub 2006 Jan 31.

Lagacé J, Péloquin L, Kermani P, Montie TC. IgG subclass responses to *Pseudomonas aeruginosa* a- and b-type flagellins in patients with cystic fibrosis: a prospective study. J Med Microbiol. 1995 Oct;43(4):270-6.

Li Z, Kosorok MR, Farrell PM, Laxova A, West SE, Green CG, Collins J, Rock MJ, Splaingard ML. Longitudinal development of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis. JAMA. 2005 Feb 2;293(5):581-8.

Likavcanova E, Lagacé J. Quantitative analysis of immunoglobulin G subclass responses to *Pseudomonas aeruginosa* antigens in cystic fibrosis. J Med Microbiol. 1992 Jun;36(6):437-44.

Marianelli L, Campana S, Taccetti G, Gabbriellini M, Dei R. *Pseudomonas aeruginosa* antibodies in patients with cystic fibrosis: clinical implications. Pediatr Med Chir. 1994 Nov-Dec;16(6):551-4.

Pedersen SS, Espersen F, Høiby N. Diagnosis of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis by enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol. 1987 Oct;25(10):1830-6.

Pressler T, Jensen ET, Espersen F, Pedersen SS, Høiby N, Koch C. Correlation between specific IgG subclass antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* and opsonic activity in serum from patients with cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol. 1994 Jan;17(1):31-40.

Pressler T, Jensen ET, Espersen F, Pedersen SS, Høiby N. High levels of complement-activation capacity in sera from patients with cystic fibrosis correlate with high levels of IgG3 antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* antigens and poor lung function. Pediatr Pulmonol. 1995 Aug;20(2):71-7.

Pressler T. IgG subclasses and chronic bacterial infection. Subclass antibodies and the clinical course of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis. APMIS Suppl. 1996;66:1-41.

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 Mar;42(3):249-55.

Tramper-Stranders GA, van der Ent CK, Wolfs TF. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. J Cyst Fibros. 2005 Aug;4 Suppl 2:37-43.

Trancassini M, De Vito D, Cimino G., Antonelli M., Quattrucci S, Cipriani P. Precipitating *Pseudomonas aeruginosa* antibodies and antimicrobial therapy in cystic fibrosis patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1996 ;15:309-312.

West SE, Zeng L, Lee BL, Kosorok MR, Laxova A, Rock MJ, Splaingard MJ, Farrell PM. Respiratory infections with *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis: early detection by serology and assessment of risk factors. JAMA. 2002 Jun 12;287(22):2958-67.