

Anticorpi anti-*Pseudomonas aeruginosa* e malattia polmonare in fibrosi cistica

Anti-Pseudomonas aeruginosa antibodies and lung disease in cystic fibrosis

Francesca Pardo, Luciana Iapichino, Mirella Collura,
Maria Lucia Furnari, Lisa Termini, Antonio Cascio*, Salvatore Giordano*

Centro Regionale Fibrosi Cistica, 2° Divisione di Pediatria,
Ospedale dei Bambini "G. Di Cristina", Palermo

*Divisione Clinicizzata di Malattie Infettive,
Ospedale dei Bambini "G. Di Cristina", Palermo

INTRODUZIONE

La Fibrosi Cistica (FC) è una malattia autosomica recessiva dovuta a mutazione di un gene posto sul braccio lungo del cromosoma 7. Questo gene codifica per una proteina, Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR), che regola ed è coinvolta nel trasporto di elettroliti attraverso la membrana cellulare delle cellule epiteliali. La mutazione più frequente è una delezione di tre paia di basi, cui corrisponde una CFTR che manca di fenilalanina in posizione 508, da cui deriva il nome $\Delta F508$ che ha ricevuto tale mutazione. Sono note inoltre più di 800 mutazioni che inducono anomalie strutturali diverse della proteina CFTR e che spiegano la variabilità di espressione clinica della malattia. In particolare la CFTR è considerata essa stessa un canale del Cl^- .

Il difettoso funzionamento della CFTR nella ghiandola sudoripara porta ad un deficit di riassorbimento del Cl^- lungo i dotti ghiandolari, determinando così l'elevata concentrazione di Cl^- sudorale patognomonico della malattia. Nelle vie aeree, al contrario, il deficit funzionale della CFTR si manifesta come insufficiente secrezione di Cl^- da parte delle cellule epiteliali, a questo si associa un accelerato riassorbimento di Na^+ , ciò comporta la presenza di secrezioni disidratate ed il ristagno di secreti densi con progressiva disfunzione degli organi interessati. Sebbene sia prevalente l'interessamento pancreatico e polmonare, complicanze frequenti sono la sindrome da perdita di sali, il diabete, la cirrosi, la patologia a carico dell'intestino precoce e tardiva ecc. [1-4].

La storia naturale di questa malattia resta, tutt'oggi, condizionata principalmente dal grado di interessamento polmonare che si manifesta con un progressivo decremento della funzionalità respiratoria. Le infezioni polmonari, virali [5] ma soprattutto batteriche, rappresentano il fattore di innesco e di mantenimento delle lesioni. Pertanto la diagnosi precoce di queste infezioni e dei loro agenti etiologici rappresenta un obiettivo rilevante e spesso di non facile attuazione [6]. Un approccio terapeutico mirato ed aggressivo delle infezioni rappresenta senz'altro la migliore strategia per consentire il miglioramento della prognosi [7]. Le caratteristiche fondamentali delle infezioni polmonari nella FC sono:

- la presenza cronica dei germi a livello delle vie aeree con episodi di riasacerbazione che si sovrappongono al quadro di base;
- localizzazione esclusiva a livello delle vie aeree, bronchi e bronchioli, senza episodi di batteriemia clinicamente rilevanti;
- numero di patogeni limitato, in alcuni casi con aspetto fenotipico caratteristico;
- flora patogena colonizzante che di solito si modifica con il progredire dell'età del paziente [8, 9].

I principali germi patogeni sono inizialmente lo *Staphylococcus aureus* e successivamente lo *Pseudomonas aeruginosa* (Pa); viene ipotizzato infatti che i danni causati a livello polmonare dallo *S. aureus* possano spianare la strada alla colonizzazione da parte dello Pa [10, 11]. In passato l'importanza dello *S. aureus* era notevole, oggi esistono antibiotici efficaci nei confronti di que-

sto germe che rendono efficace il trattamento. Tra i Gram negativi i vari ceppi di Pa rappresentano i patogeni principali [12]. La colonizzazione iniziale da parte di Pa è di solito causata da ceppi con aspetto morfologico delle colonie rugose, con il progredire del tempo le colonie assumono aspetto di tipo mucoside. Tali modifiche sono da attribuire alla produzione di alginate, un esopolisaccaride sinterizzato per una depressione genica di informazioni presenti nell'ampio genoma di questo germe [13, 14].

Pa ha una particolare adattabilità al microambiente polmonare e questo si riflette in un'alta resistenza alla chemioterapia [15, 16].

Nei pazienti (pz) con FC la presenza di Pa sulle superfici epiteliali delle cellule respiratorie, induce una risposta immunitaria che è inefficace ad eliminare i germi ma in grado di compromettere progressivamente la funzionalità delle vie aeree. La correlazione tra risposta anticorpale e prognosi sembra sia dovuta agli IC che mediano l'infiammazione cronica [17, 18].

Obiettivo del nostro studio è stato quello di diagnosticare correttamente e monitorare tre aspetti della evoluzione della malattia polmonare nella FC: l'assenza di infezione da Pa, la colonizzazione intermittente e l'infezione cronica. Il passaggio dall'una all'altra di queste situazioni rappresenta una tappa importante nella storia naturale della malattia e della sua prognosi e mette in moto una serie di strategie terapeutiche antibiotiche più o meno aggressive a seconda della evenienza [19-21].

A tal fine è stata presa in considerazione la possibilità di uno studio del ruolo degli anticorpi (Ab) anti-Pa (anti-proteasi, elastasi, esotossina A) sia nella diagnosi che nel follow-up dei pz con FC. Per un migliore inquadramento abbiamo inoltre correlato la presenza di anticorpi con la presenza di Pa, valutata con la coltura dell'escreato o dell'aspirato in ipofaringe ottenuto dopo una seduta di fisioterapia; con il deterioramento polmonare (FEV1); con l'età del pz e con il genotipo.

■ MATERIALI E METODI

Gli Ab anti-Pa sono stati dosati nel siero di 121 pz affetti da FC (M 56, F 65) con un'età media di 15 anni (range 15 mesi - 50 anni). È stata utilizzata la metodica ELISA di tipo quantitativo che consente di evidenziare Ab diretti contro antigeni specifici di Pa (elastasi, proteasi, esotossina A) con una buona specificità e sensibilità. Sono

stati considerati negativi i valori < 1:500; borderline >1:500 e < 1:1250 e positivi > 1250. Nella suddivisione dei pz nelle tre categorie su menzionate sono stati considerati positivi o borderline i pazienti con almeno la presenza di uno dei tre anticorpi saggiati.

■ RISULTATI

20 pz pari al 16.5% non presentavano Ab; 17 pz (14%) avevano valori borderline e 84 (69,5%) avevano valori positivi.

La coltura dell'escreato eseguita in tutti i 121 pz ha dato esito negativo in 29 pz (24%), una colonizzazione intermittente in 11 (9%) e una colonizzazione cronica in 81 (67%).

In accordo con i dati della letteratura i valori degli Ab si sono dimostrati significativamente diversi nei pz non colonizzati, con colonizzazione intermittente e con colonizzazione cronica (Fig. 1). Tutti i 20 pz con Ab negativi hanno presentato una coltura negativa per Pa nell'escreato. Dei 17 pz con anticorpi borderline 8 (47%) avevano almeno una coltura positiva e 9 (53%) coltura negativa. 84 pz avevano Ab positivi, di essi 73 (87%) avevano una colonizzazione cronica mentre gli altri 11 (13%) avevano una colonizzazione intermittente (Fig. 1).

La correlazione tra anticorpi e funzionalità polmonare è stata valutata tramite FEV1 in 82 pz suddivisi in due gruppi (FEV1 < 60 n. 38 pz. e FEV1 > 60 n. 44 pz.) (Fig. 2). L'aumento degli Ab si correla con un peggioramento della malattia polmonare con significatività statistica ($p < 0.013$).

L'età media dei 20 pz con Ab negativi è di 9,8 anni (età mediana 8 anni, età minima 15 mesi, massima 50 anni); dei 17 con Ab borderline è di 15.1 anni (età mediana 15 anni, età minima 16 mesi, massima 29,5 anni); gli 84 pz con Ab positivi hanno un'età media di 16 anni (età mediana 16 anni, età minima 20 mesi, massima 42,5 anni).

Il genotipo è stato esaminato in 98 pz dei 121 pazienti arruolati. Sono state saggiate le 20 mutazioni, la cui sensibilità è di circa il 70%, risultate essere più frequenti nella popolazione siciliana (Iapichino L., D'Alcamo E., dati non pubblicati).

Nei 69 pz con Ab positivi, la prevalenza di $\Delta F508$ (mutazione considerata grave) in omo o eterozigosi è del 82% (57 pz.); nei 12 pz con Ab borderline è del 91%; nei 17 pz negativi è del 58%.

D'altro canto in 28 dei 38 pz con Ab positivi,

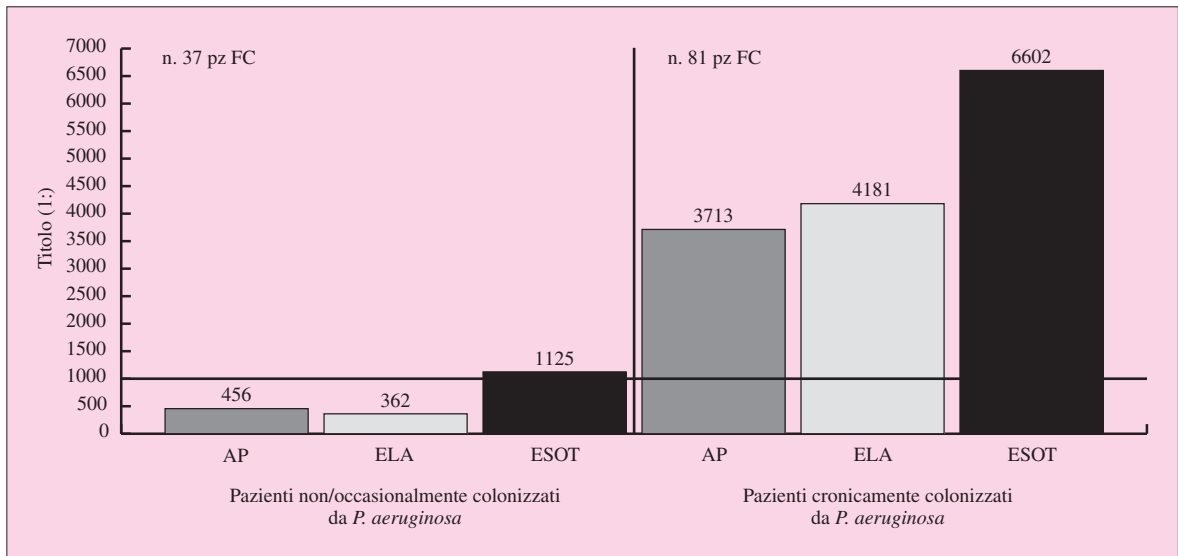


Figura 1 - Valore medio di Anticorpi anti proteasi (AP), elastasi (ELA) ed esotossina A (ESO) determinati con metodo ELISA in 37 pazienti (non colonizzati o colonizzati cronicamente) e 81 pazienti colonizzati cronicamente.

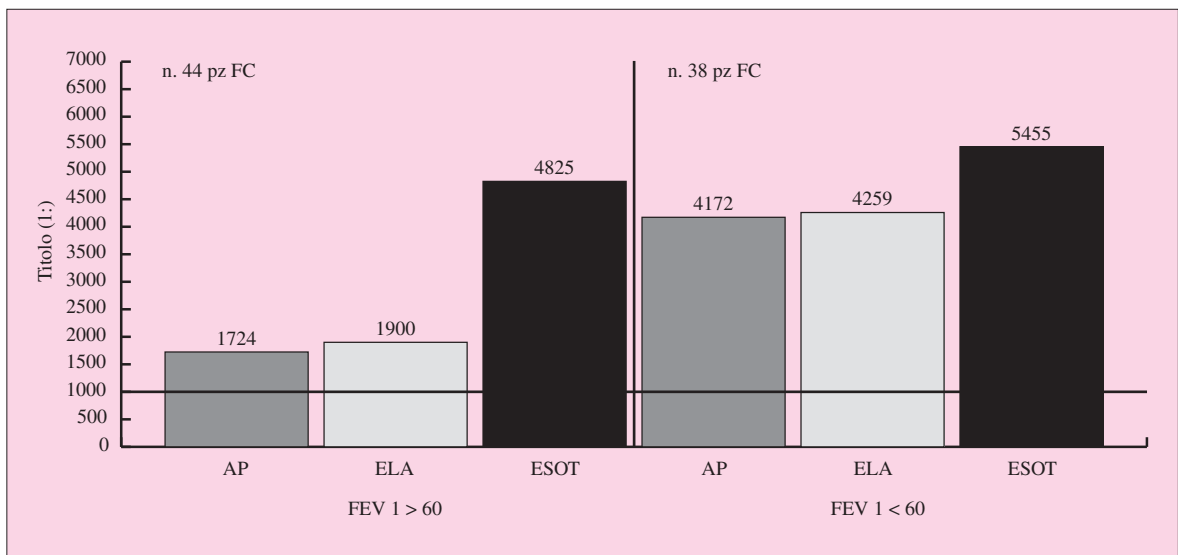


Figura 2 - Correlazione del valore medio di Anticorpi anti proteasi (AP), elastasi (ELA) ed esotossina A (ESO) determinati con metodo ELISA in due gruppi di pazienti suddivisi in base alla funzionalità polmonare.

eterozigoti alla ΔF , la mutazione riscontrata sull'altro cromosoma era anch'essa grave. Tra i 17 pz con Ab negativi che presentano la $\Delta F508$, solo 5 erano omozigoti mentre nei restanti 5 eterozigoti nessuno presentava mutazione grave sull'altro allele.

La gravità del genotipo correla con la positività degli Ab anti Pa indicando che una CFTR più grossolanamente alterata favorisce la colonizzazione da Pa ed il conseguente elevato titolo anticorpale.

CONCLUSIONI

I dati in nostro possesso ci consentono di fare alcune importanti considerazioni dal punto di vista clinico, terapeutico e prognostico.

La popolazione di pz negativi per Ab e coltura è formata da soggetti di età significativamente minore con malattia polmonare più lieve e genotipo mild.

Vi è in questa popolazione indicazione ad attuare alcune misure di tipo igienico-ambientale

all'interno dei Centri per la FC atte ad evitarne il contatto con pz positivi per Pa ed inoltre ad attuare un programma di vaccinazione anti-Pa come viene più spesso segnalato in letteratura [20, 21].

Nei pz borderline, alle considerazioni precedenti, va aggiunta secondo i dati di evidenza della letteratura una strategia antibiotica aggressiva che abbia come obiettivo l'eradicazione delle possibili colture positive al fine di evitare o quanto meno ritardare il passaggio all'infezione cronica, elemento prognostico sempre sfavorevole [22, 23].

Gli elevati titoli anticorpali rilevati nei pz con infezione cronica confermano il dato che la loro

presenza risulta essere un indice fedele del danno polmonare e come tale strettamente collegata ad una prognosi peggiore. A differenza infatti che in altre patologie infettive, la risposta immunitaria caratterizzata da un elevato titolo, nella FC non protegge ma è correlata con meccanismo patogenetico dimostrato, ad una malattia più grave.

In conclusione il dosaggio degli anticorpi anti-Pa rappresenta un valido ausilio diagnostico nel follow-up della malattia polmonare nella FC.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa* - antibodies, cystic fibrosis.

RIASSUNTO

Obiettivo del nostro studio è stato quello di diagnosticare tre aspetti della evoluzione della malattia polmonare nella Fibrosi Cistica. L'assenza di infezione da *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), la colonizzazione intermittente e l'infezione cronica. È stata presa in considerazione la possibilità di uno studio del ruolo degli anticorpi (Ab) anti-Pa (anti-proteasi, elastasi, esotossina A) nella diagnosi e nel follow-up. Abbiamo correlato la presenza di Ab con la coltura dell'escreato, con il FEV1, con l'età del pz e con il genotipo. Gli Ab sono stati dosati nel siero di 120 pz con metodica ELISA. Sono stati considerati negativi valori < 1:500, borderline > 1:500 < 1:1250, e positivi > 1:1250.

Il 16,5% dei pz non presentavano Ab, il 17% valori borderline e il 69,5% valori positivi. I pz con Ab negativi hanno presentato una coltura negativa, i pz con Ab borderline avevano nel 47% almeno una coltura positiva, mentre nel 53% erano negativi. I pz con Ab positivi nell'87% dei casi avevano una colonizzazione cronica, nel 13% una colonizzazione intermittente. L'aumento degli Ab si correla con un peggioramento della malattia polmonare ($p < 0.013$). La gravità del genotipo ($\Delta F08$) correla con la positività degli Ab anti Pa Il dosaggio degli Ab anti-Pa rappresenta un valido ausilio diagnostico nella diagnosi e nel follow-up della malattia polmonare nella FC.

SUMMARY

*The aim of our study was to diagnose and to control three aspects of the evolution of lung disease in CF: the absence of infection, the intermittent colonization and chronic infection by *Pseudomonas aeruginosa*.*

Therefore a study of anti-pseudomonas antibodies (Ab) (anti-protease, anti-elastin and antihexotoxin A) for diagnosis and follow-up of CF patients was considered. Moreover, we related the presence of Ab to the sputum culture, to FEV1, to patient age and to genotype. The Ab were dosed in 121 patients by quantitative ELISA method. Values < 1: 500 were considered negative, values > 1: 500 and < 1:1250 borderline, and > 1:1250 posi-

tive. 16.5% of patients did not have Ab, 17% had borderline values and 69.5% had positive values. All the patients with negative Ab had negative sputum culture; 47% of patients with borderline values had at least one positive culture while 53% were negative. 87% of patients with positive values had chronic colonization, 13% intermittent colonization.

*The increase in the Ab rate is statistically related to a more severe lung disease ($p < 0.013$). The presence of a severe mutation ($\Delta F 508$) is related to positive values of Ab. Evaluation of anti-*Pseudomonas aeruginosa* is an important tool for diagnosis and follow-up of CF lung disease*

■ BIBLIOGRAFIA

- [1] Kerein B., Rommens J.M., Buchanan J.A., et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245: 1073-1080, 1989.
- [2] Quinton P.M. Cystic Fibrosis: old questions, new answers. The second Joseph Levy Memorial Lecture, Paris, May 1994.
- [3] Hoiby N., Koch C., Frederiksen B. Cystic Fibrosis. *Nord Med.* Dec; 113, 328-330, 1998.
- [4] Davis P., Drumm M., Konstan M.W. State of art: cystic fibrosis. *Am J Resp Crit Care Med.* 154, 1229-1256, 1996.
- [5] Abnam S.H., Ogle J.W., Butler-Simon N., Rumack C.M., Accurso F.J. Role of respiratory Syncytial virus in early hospitalizations for respiratory distress of young infants with cystic fibrosis. *J Pediatr.* 113(5), 826-830, 1988.
- [6] Khan T.Z., Wagener J.S., Bost T., Martinez J., Accurso F.J., Riches D.W.H. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 151, 1075-1082, 1995.
- [7] Johansen H.K., Kovesi T.A., Koch C., Corey M., Hoiby N., Levison H. *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacea* infection in Cystic Fibrosis patients treated in Toronto and Copenhagen. *Pediatr Pulmonol* 26(2), 89-96, 1998.
- [8] Microbiology and Infectious disease in CF. Concepts in Care. Consensus Conference. *CF Foundation V:* 1-26, 1994.
- [9] FitzSimmons SC. The changing epidemiology of cystic fibrosis. *J. Pediatr.* 122(1), 1-9, 1993.
- [10] Pier GB, Grout M, Zaidi TS. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(22), 12088-12093, 1997.
- [11] Farrel P.M., Shen G.H., Splaingard M., et al. Acquisition of *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis. *Pediatrics* 100(5), E21-E29, 1997.
- [12] Hoiby N. *Pseudomonas* in Cystic Fibrosis: past, present, future. The Fourth Joseph Levy Memorial Lecture, Berlin, June 1998.
- [13] Pederson S.S., Hoiby N., Espersen F., Koch C. Role of alginate in infection with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Thorax* 47, 6-13, 1992.
- [14] Govan J.R.W., Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacea*. *Microbiol. Rev.* 60(3), 539, 1996.
- [15] Ciofu O., Giwercman B., Pedersen S.S., Hoiby N. Development of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* during two decades of antipseudomonal treatment at the Danish CF Center. *APMIS* 102(9), 674-680, 1994.
- [16] Ciofu O., Giwercman B., Walterasmussen J., Presier T., Pedersen S.S., Hoiby N. Antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal betalactamase in patients with Cystic Fibrosis are makers of the development of resistance of *P. aeruginosa* to beta-lactams. *J. Antimicrob. Chemoter.* 35(2), 295-304, 1995.
- [17] Kromborg G., Ansen M., Svenson M., Fomsgaard A., Hoiby N., Bendtzen K. Cytokines in sputum and serum from patients with cystic fibrosis and chronic *Pseudomonas* infection as markers of destructive inflammation in the lungs. *Pediatr. Pulmonol.* 15, 292-297, 1993.
- [18] Konstan M.W., Berger M. Current understanding of the inflammatory process in cystic fibrosis: onset and etiology. *Pediatr. Pulmonol.* 24, 137-142, 1997.
- [19] Valerius N.H., Koch C., Hoiby N. Prevention of chronic *Pseudomonas* colonization in cystic fibrosis by early treatment. *Lancet* 338, 725-726, 1991.
- [20] Cryz S.J., Lang A., Rudcberg A. et al.: Immunization of cystic fibrosis patients with *Pseudomonas aeruginosa*-polysaccharide-toxin A conjugate vaccine. *Behring Inst. Mitt.* Feb. (98), 345-349, 1997.
- [21] Doring G., Dorner F. A multicenter vaccine trial using the *Pseudomonas aeruginosa* flagella vaccina IMMUNO in patients with cystic fibrosis. *Mitt* (98), 338-344, 1997.
- [22] Frederiksen B., Lannig S., Koch C., Hoiby N. Improved survival in the Danish Center-treated cystic fibrosis patients: results of aggressive treatment. *Pediatr. Pulmonol.* 21, 153-158, 1996.
- [23] Frederiksen B., Koch C., Hoiby N. Antibiotic treatment of initial colonization with *Pseudomonas aeruginosa* postpones chronic infection and prevents deterioration of pulmonary function in cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 23, 330-335, 1997.