

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE LISBOA**



**DIAGNÓSTICO DA INFEÇÃO POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*  
ATRAVÉS DE SEROLOGIA NA POPULAÇÃO PEDIÁTRICA DO  
CENTRO DE FIBROSE QUÍSTICA DO HOSPITAL DE SANTA MARIA**

Susana Isabel Ferreira Castanhinha

Orientador: Professor Doutor José Augusto Melo-Cristino

Co-Orientadora: Dra. Teresa Rodrigues

Mestrado: Doenças Infeciosas Emergentes

Dissertação

2015

Todas as afirmações efetuadas no presente documento são da exclusiva responsabilidade da sua autora, não cabendo qualquer responsabilidade à Faculdade de Medicina de Lisboa pelos conteúdos nele apresentados.

**A impressão desta dissertação foi aprovada pelo Conselho Científico da Faculdade de Medicina de Lisboa em reunião de 22 de setembro de 2015.**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Doutor José Melo-Cristino, agradeço a oportunidade de me ter integrado na sua equipa de laboratório assim como o tempo que disponibilizou e os conhecimentos transmitidos no decorrer deste trabalho.

À Dra. Teresa Rodrigues agradeço a sua disponibilidade, o enorme empenho na análise estatística e na motivação em avançar com o projeto.

Ao Professor Doutor Mário Ramirez, agradeço o seu apoio e auxílio na organização do projeto laboratorial.

À Doutora Sandra Aguiar, agradeço pela amizade, apoio e tempo dispensado para a execução das técnicas laboratoriais.

À Dra. Celeste Barreto e à Dra. Luísa Pereira um grande bem-haja por me terem dado a conhecer a Fibrose Quística e por me motivarem sempre a iniciar novos desafios clínicos e de investigação. Agradeço a disponibilidade no recrutamento dos doentes.

À Professora Doutora Emília Valadas, agradeço pelo despertar da curiosidade inerente à investigação científica.

A todos os outros profissionais de saúde que colaboraram neste trabalho, designadamente às Sras. Enfermeiras da consulta externa de Pediatria e à Dra. Rita Jotta, o meu sincero agradecimento.

E, acima de tudo, agradeço à minha família, que demonstrou infinita paciência nas minhas ausências e apoio em todos os meus projetos académicos e profissionais. Dedico esta dissertação em especial à minha mãe, aos meus filhos Zé e Manel Maria, ao meu marido Henrique, ao meu pai e aos meus irmãos Rui e Filipa.

## RESUMO

A Fibrose Quística (FQ) é a doença genética hereditária mais frequente em caucasianos. A infeção pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa* é a principal causa de morbilidade e mortalidade, podendo ser difícil diagnosticar a infeção precoce em crianças. Dado que a determinação de anticorpos (Ac) apresenta elevada capacidade preditiva na deteção desta infeção, pretendeu-se neste trabalho realizar uma avaliação do método serológico em doentes do grupo pediátrico do Centro de FQ do Hospital de Santa Maria.

Realizou-se um estudo retrospectivo transversal entre 2010-2011. Procedeu-se à determinação de Ac anti-*P. aeruginosa* utilizando um teste serológico de imunoglobulina G que inclui três proteínas de *P. aeruginosa* (protease alcalina, elastase, exotoxina A), considerando a cultura como referência. Analisaram-se os dados microbiológicos e clínicos dos 12 meses prévios à entrada no estudo.

Foram incluídos 37 doentes (género feminino 59,5%; idade mediana 10,8 anos). A determinação de Ac anti-*P. aeruginosa* foi positiva em 10 doentes e negativa em 27. Todos os doentes com infeção crónica apresentaram determinação de Ac positiva, que foi negativa em todos os doentes livres de infeção. Dos 15 doentes com infeção intermitente, dois apresentaram determinação positiva. Na deteção da infeção global por *P. aeruginosa*, o método serológico revelou especificidade e valor preditivo do positivo de 100%, sensibilidade de 43,5% e valor preditivo do negativo de 51,9% (exatidão: 64,8%). Na deteção da infeção crónica, a especificidade, a sensibilidade, o valor preditivo do positivo e do negativo foram todos de 100% (exatidão: 100%). Os

doentes com determinação positiva de Ac apresentaram z-score de índice de massa corporal significativamente inferior e pior função respiratória.

Este é o primeiro trabalho realizado em Portugal, de que temos conhecimento, que avalia a determinação de Ac na infeção por *P. aeruginosa*. O método serológico pode ser considerado como um teste adjuvante ao exame cultural, para avaliar a infeção por *P. aeruginosa* num grupo de crianças e jovens com FQ.

**Palavras-chave:** Fibrose quística, *Pseudomonas aeruginosa*, infeção pulmonar, serologia, crianças

## ABSTRACT

Cystic Fibrosis (CF) is the most frequent hereditary genetic disease in caucasians. Pulmonary infection by *Pseudomonas aeruginosa* is the main cause of morbidity and mortality, but early infection in children may be difficult to diagnose. Antibody measurements present high predictive capacity to diagnose this infection. The aim of this study was to evaluate serology in patients followed in the pediatric group of the specialized CF centre of Hospital de Santa Maria.

A cross sectional retrospective analysis was performed between years 2010-2011. Antibodies against three *P. aeruginosa* antigens were measured (alkaline protease, elastase, exotoxin A) using an immunoglobulin G commercial serologic test. Culture was considered as reference standard. Microbiologic and clinical parameters were analyzed in the 12 months previous to serology.

This study included 37 patients (59,5% girls; median age of 10,8 years). Antibody measurements against *P. aeruginosa* were positive in 10 patients and negative in 27.

All the patients with *P. aeruginosa* chronic infection showed positive serology, and it was negative in all the patients free of infection. Serology was positive in two of the 15 patients with intermittent infection.

Serology had 100% specificity, 43,5% sensitivity, 100% positive predictive value, 51,9% negative predictive value (accuracy: 64,8%) for global *P. aeruginosa* infection. For the detection of chronic infection, serology revealed 100% of specificity, sensitivity, positive predictive value, and negative predictive value (accuracy: 100%). Patients with positive serology had significant lower median body mass index z-score and worse pulmonary function.

This is the first study in Portugal, that we know so far, concerning serology evaluation for the diagnosis of *P. aeruginosa* infection. Serology may be considered as an adjuvant to culture to evaluate *P. aeruginosa* infection in children and young patients with CF.

**Key-words:** Cystic fibrosis, *Pseudomonas aeruginosa*, pulmonary infection, serology, children.

## ABREVIATURAS

Ac - Anticorpo

Ag – Antigénio

ADP - Adenosina-5'-difosfato

AMPc - Adenosina-5'-monofosfato cíclico

AP - Protease alcalina

ARN - Ácido ribonucleico

ATP – Adenosina-5'-trifosfato

BCC - Complexo *Burkholderia cepacia*

CFTR – *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*

CHLN - Centro Hospitalar Lisboa Norte

CVF - Capacidade vital forçada

Ela - Elastase

ENaC - Canal epitelial de sódio

ExoA - Exotoxina A

FEF 25-75 - Fluxo expiratório forçado entre 25% e 75% da CVF

FQ - Fibrose Quística

HSM - Hospital de Santa Maria

IgG – Imunoglobulina G

IMC – Índice de massa corporal

LBA - Lavado bronco-alveolar

LepA - *Large extracellular protease*

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à metilina

MSSA - *Staphylococcus aureus* sensível à metilina

NF-kappaB - Fator nuclear kappa B

VEMS - Volume expirado máximo por segundo

VPN - Valor preditivo do negativo

VPP - Valor preditivo do positivo

T3SS - Efetor do sistema de secreção tipo III

## ÍNDICE

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>i</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>ii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE</b> .....	<b>vii</b>
<b>1 - INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 - A doença: Fibrose Quística.....	1
1.1.1 - Epidemiologia.....	5
1.1.2 - Fisiopatologia.....	6
1.1.3 - Critérios de diagnóstico da Fibrose Quística.....	7
1.2 - O agente patogénico: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	8
1.2.1 - Estabelecimento e manutenção da infeção.....	9
1.2.2 - Infeção pulmonar de <i>P. aeruginosa</i> em doentes com FQ.....	13
1.2.3 - Resposta imunitária do hospedeiro com FQ.....	15
1.2.4 - Detecção da infeção por <i>P. aeruginosa</i> .....	16
<b>2 - OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
<b>3 - MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
3.1 - População-alvo.....	20
3.2 - Desenho do estudo.....	22
3.3 - Amostragem e recrutamento.....	23
3.4 - Serologia.....	24
3.4.1 - Breve descrição do teste.....	24
3.5 - Exame microbiológico de secreções respiratórias.....	25
3.6 - Dados clínicos.....	26
3.7 - Análise estatística.....	27
<b>4 - RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
4.1 - Caracterização da amostra.....	30
4.2 - Método serológico.....	31
4.3 - Características clínicas de acordo com a determinação de Ac.....	35
<b>5 - DISCUSSÃO</b> .....	<b>40</b>
<b>6 - CONCLUSÕES</b> .....	<b>48</b>
<b>7 - LIMITAÇÕES DO ESTUDO E PERSPETIVAS FUTURAS</b> .....	<b>50</b>
<b>8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>52</b>

## 1 – INTRODUÇÃO

---

### 1.1 – A doença: Fibrose Quística

A Fibrose Quística (FQ), descrita pela primeira vez como entidade nosológica em 1938 por Dorothy Hansine Andersen <sup>3</sup>, é a doença genética hereditária potencialmente letal mais frequente entre caucasianos <sup>12</sup>. A tríade sintomática clássica consiste em doença sinopulmonar crónica, insuficiência pancreática, e infertilidade masculina, associados a níveis elevados de iões cloreto no suor (> 60 mEq/L) <sup>45</sup>.

Tipicamente, a FQ afeta as vias respiratórias por obstrução com muco espesso e infeções crónicas, principalmente por *Pseudomonas aeruginosa*, conduzindo a insuficiência respiratória; e provoca também malnutrição por disfunção pancreática, intestinal e hepática <sup>45</sup>. A apresentação clínica pode ser atípica em 10-15% dos casos, sendo possível o predomínio de apenas uma manifestação, designadamente alterações eletrolíticas, pancreatite, doença hepática, sinusite ou azoospermia obstrutiva <sup>45, 56, 115</sup>.

A FQ é uma doença monogénica autossómica recessiva causada por mutações do gene *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, CFTR (ATP-binding cassette sub-família C, membro 7) localizado no cromossoma 7 que codifica a síntese da proteína transmembranar CFTR <sup>1, 52, 107</sup>. A CFTR é constituída por 1480 aminoácidos e localiza-se na superfície apical das células epiteliais <sup>109</sup>. Esta proteína

funciona como um canal anião-seletivo, com predominância para os iões cloreto, regulado pela adenosina-5'-monofosfato cíclico (AMPc) <sup>15</sup>.

Atualmente existem 2001 mutações descritas <sup>25</sup>. A mutação mais frequente a nível mundial é a F508del <sup>19, 103</sup>, que corresponde a 2/3 de todos os alelos do gene CFTR de indivíduos com FQ, apresentando uma prevalência decrescente do noroeste para o sudeste europeu. O restante terço de alelos é heterogéneo <sup>19</sup>. A F508del corresponde a uma deleção de três pares de base no exão 10, que leva à perda do aminoácido de fenilalanina na posição 508 <sup>19, 53</sup>. Em Portugal, são reconhecidas 15 mutações do gene CFTR como as mais frequentes, correspondendo estas a 81,6% das mutações na população portuguesa <sup>96</sup>.

As várias mutações do gene CFTR levam a diferentes consequências funcionais dentro da célula, o que permite agrupá-las em 6 classes funcionais, de I a VI <sup>7, 53, 122</sup>. As mutações de classe I originam codões stop prematuros que formam proteínas instáveis, truncadas ou que bloqueiam mesmo a sua expressão <sup>53</sup>. A classe II inclui todas as mutações que provocam um processamento pós-transcricional inadequado, resultando numa proteína defeituosa que é retida no retículo endoplasmático, com degradação subsequente no proteassoma e falha no transporte da proteína até à membrana, como é o caso da F508del <sup>2</sup>. As mutações de classe III permitem a produção e transporte intracelular da proteína, mas afetam a ativação e regulação na membrana celular, mediadas pela AMPc. A classe IV inclui mutações que provocam redução da condutância de cloreto pelo canal, apesar da sua adequada regulação <sup>2</sup>. As mutações de classe V provocam uma redução significativa do ácido ribonucleico (ARN) mensageiro ou dos níveis de CFTR, embora com função normal, enquanto as

mutações de classe VI implicam um aumento do *turnover* da CFTR na superfície celular<sup>2</sup>.

A expressão do gene é observada numa grande variedade de tecidos, com maior predominância nos pulmões, criptas intestinais, pâncreas, fígado, sistema hepatobiliar, mucosa nasal, glândulas sudoríparas e sistema reprodutivo. As várias mutações apresentam como consequência, e em última análise, a ausência ou o mau funcionamento da proteína CFTR na membrana apical das células epiteliais secretoras a nível destes tecidos<sup>111</sup>.

A grande variabilidade na presença e gravidade de mutações do gene CFTR evidencia a grande diversidade de mutações do gene<sup>128</sup>. Existe correlação entre o genótipo e o fenótipo relativamente à insuficiência pancreática (associada a mutações das classes I, II e III) o que não se verifica, em geral, na doença pulmonar<sup>95</sup>.

A gravidade e prognóstico da FQ são avaliados através de vários parâmetros. O genótipo pode ser preditor de prognóstico, na medida em que as mutações de classe I, II e III originam geralmente um fenótipo grave de FQ, estando associadas a insuficiência pancreática e, por sua vez, ao declínio mais rápido da função respiratória<sup>22</sup>.

No entanto, os principais fatores de prognóstico são a função respiratória e o estado nutricional<sup>90, 11</sup>.

Os parâmetros do estudo funcional respiratório mais valorizados são o volume expirado máximo por segundo (VEMS), a capacidade vital forçada (CVF) e o fluxo expiratório forçado entre 25% e 75% da CVF (FEF25-75), medidos em percentagem do previsto para a idade e género<sup>11</sup>. As modificações destes parâmetros traduzem o estágio da doença e podem ser critérios de agudização pulmonar, através da redução

de 15-20% do VEMS <sup>11</sup>. A doença caracteriza-se, inicialmente, por um padrão obstrutivo das pequenas vias aéreas, quantificável precocemente através do FEF25-75 e posteriormente através do VEMS e, numa fase de maior destruição pulmonar, pela CVF. O VEMS apresenta diminuição progressiva ao longo do tempo de evolução da doença, sendo indicadores de gravidade os valores de VEMS inferiores a 30% do previsto e/ou declínios anuais superiores a 4% (em doentes até aos 18 anos) ou de 2% (em adultos) <sup>11</sup>.

O estado nutricional é geralmente avaliado pelo índice de Massa Corporal, IMC, que se correlaciona com o prognóstico da doença <sup>44, 90</sup>.

A presença de infeção por determinados microrganismos, como *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae* são comuns em crianças pequenas <sup>85, 118</sup>. A infeção crónica causada por vários microrganismos confere mau prognóstico, principalmente por *P. aeruginosa* <sup>45, 81</sup>, mas também por *S. aureus* <sup>68</sup>, *S. aureus* resistente à metilina (MRSA) <sup>85</sup>, complexo *Burkholderia cepacia* (BCC) <sup>84, 98</sup>, *H. parainfluenzae*, micobactérias atípicas e *Aspergillus fumigatus* <sup>53</sup>.

A idade do doente ao diagnóstico tem impacto no prognóstico a longo prazo <sup>44</sup>. De acordo com séries internacionais, doentes com FQ cujo diagnóstico foi feito numa idade precoce através do rastreio neonatal, apresentaram peso e estatura superiores no momento do diagnóstico do que doentes com diagnósticos mais tardios. Estas diferenças mantiveram-se a longo prazo, demonstrando que a estatura e peso superiores, e como tal IMC superior, correlacionam-se com melhor função respiratória <sup>44</sup>. Estes achados reforçam o valor dos testes de rastreio, pois contribuem para a melhoria do prognóstico da doença ao permitirem um diagnóstico mais precoce e, conseqüentemente, um início de tratamento antecipado <sup>44, 48</sup>.

### 1.1.1 – Epidemiologia

A incidência global da FQ, em caucasianos, é de 1:3 500 nascimentos por ano <sup>45</sup>. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, na União Europeia a incidência global da doença é de 1:2 000 a 1:3 000. Além da Europa, existe uma incidência elevada na população da América do Norte e da Austrália <sup>127</sup>.

Em Portugal, a incidência anual estimada em 2004 era de 1:6 000 <sup>45</sup>. Os primeiros dados analisados do projeto de rastreio neonatal de FQ em Portugal revelaram que, entre outubro de 2013 e de 2014, foram diagnosticados 10 doentes correspondendo a uma incidência anual no nosso país de 1:8 000 <sup>114</sup>. Este projeto de rastreio, existente em Portugal desde outubro de 2013, é oferecido a todos os recém-nascidos nascidos em maternidades portuguesas, realizando-se entre o 3º e 6º dia de vida <sup>114</sup>.

Tem-se verificado, nas últimas décadas, um aumento significativo da esperança média de vida dos doentes com FQ <sup>24, 32</sup>. Tal pode ser atribuído a fatores como a melhor compreensão da doença, introdução atempada de antibioticoterapia e de reabilitação respiratória, melhor nutrição, diagnóstico mais precoce e ao seguimento em centros especializados <sup>32</sup>. De acordo com os dados da *Cystic Fibrosis Foundation*, em 1985 a esperança média de vida era de 27 anos de idade e em 2012 foi de 40,7 anos nos Estados Unidos da América <sup>26</sup>. Na Europa, a idade mediana de sobrevivência relatada foi variável entre 9,5-38,8 anos <sup>24, 32</sup>.

Em Portugal não há dados oficiais nacionais, no entanto, de acordo com o calculado para uma população de doentes em seguimento, entre 1969 e 2008, na consulta de FQ do Centro Especializado de FQ do Hospital de Santa Maria (HSM), Centro

Hospitalar Lisboa Norte (CHLN), a sobrevida média era de 30,7 anos [20,1;41,3]<sup>97</sup>.

### 1.1.2 – Fisiopatologia

A proteína CFTR apresenta como função a regulação do transporte de iões cloreto em células epiteliais<sup>111</sup> e a redução da atividade do canal epitelial de sódio, ENaC<sup>1, 117</sup>. Apontam-se outras possíveis funções, designadamente o transporte de bicarbonato e a regulação de outros canais iónicos, designadamente canais de cloreto e cálcio<sup>109</sup>.

Como consequência do defeito genético, a depleção de CFTR e a diminuição da repressão de ENaC implicam um transporte inadequado de cloreto e de água através da superfície epitelial de todo o organismo, originando, assim, concentrações anormais de cloreto nas membranas apicais das células epiteliais dos órgãos referidos<sup>103</sup>. Esta anomalia despoleta várias manifestações que incluem doença pulmonar progressiva (com infeção crónica das vias aéreas e bronquiectasias), insuficiência pancreática exócrina com mal nutrição, infertilidade masculina, função anormal das glândulas sudoríparas com aumento de eletrólitos no suor, íleus meconial e cirrose biliar multifocal<sup>103</sup>.

Nas vias áreas dos doentes com FQ, ocorre perda de secreção de cloreto e de água, bem como aumento do aporte de sódio nas células epiteliais secretoras<sup>117</sup>. Consequentemente, existe redução da espessura da camada da superfície líquida, formação de muco mais espesso, estase ciliar (ou ciliostase), diminuição da drenagem mucociliar e pior funcionamento dos mecanismos de controlo de infeções (opsonização, fagocitose e penetração de antibióticos)<sup>20</sup>. O ambiente pulmonar

alterado origina um cenário favorável para infecções bacterianas, principalmente causadas por *P. aeruginosa*, ocorrendo a instalação precoce de infecção crónica com progressiva destruição pulmonar. A infecção mantida pode originar um ciclo de inflamação contínua, destruição pulmonar e controlo da infecção cada vez mais difícil<sup>112</sup>. Por sua vez, este ciclo de inflamação-infecção pode conduzir a insuficiência respiratória progressiva<sup>60, 69</sup>.

### 1.1.3 – Critérios de diagnóstico da FQ

Para estabelecer o diagnóstico de FQ são necessárias duas condições, que consistem na presença de critérios clínicos e na evidência laboratorial de disfunção de CFTR. Um diagnóstico positivo depende da presença de um quadro clínico com uma das características (A) ou (B ou C) e um teste laboratorial confirmatório (D, E ou F), tal como descrito de seguida<sup>28, 109, 115</sup>:

- A) Características fenotípicas: Doença sinopulmonar crónica. Alterações gastrointestinais ou nutricionais. Síndrome da perda de sal. Anormalidades urogenitais.
- B) História de FQ num irmão.
- C) Teste de rastreio neonatal positivo.
- D) Concentração de cloreto no suor elevada.
- E) Identificação de 2 mutações do gene CFTR conhecidas como causadoras de FQ.

F) Demonstração *in vivo* da alteração típica do transporte iónico através do epitélio nasal na FQ ou *in vitro* de diminuição da secreção de cloreto a nível do epitélio de biópsias retais.

Apesar dos sintomas, sinais e achados laboratoriais característicos, o estabelecimento do diagnóstico atempado permanece um dos maiores desafios, podendo a sua falha causar atrasos consideráveis em termos de intervenção no curso da doença <sup>46</sup>.

### **1.2 – O agente patogénico: *Pseudomonas aeruginosa***

*P. aeruginosa* é uma bactéria de Gram negativo (não fermentadora, aeróbia), ubiqüitária e oportunista com versatilidade metabólica <sup>8, 60</sup>. *P. aeruginosa* foi identificada pela primeira vez em 1872 por Schroeter, tendo sido denominada inicialmente por *Bacterium aeruginosum* <sup>65</sup>. Posteriormente, em 1900, Migula descreveu a espécie *P. aeruginosa* <sup>113</sup>. No ano 2000 foi publicada a sua sequenciação genómica completa <sup>116</sup>.

As infeções ocorrem, geralmente, em doentes com imunossupressão, com infeções associadas à hospitalização (nosocomiais), bem como associadas a lesão epitelial nos olhos, ouvidos ou pele. *P. aeruginosa* constitui, também, uma causa frequente de bacteriémia em doentes queimados e de infeções do trato urinário resultantes de cateterização <sup>16, 124</sup>. A infeção pulmonar por *P. aeruginosa* é comum em doentes com FQ, com outras doenças pulmonares obstrutivas crónicas ou com pneumonia associada a ventiladores <sup>16, 124</sup>.

Em doentes com FQ existe um ambiente favorável ao estabelecimento da infeção por

*P. aeruginosa*, essencialmente devido ao espessamento do muco, à redução da espessura da superfície líquida nas vias aéreas e à estase ciliar<sup>20</sup>.

### 1.2.1 – Estabelecimento e manutenção da infecção

O pulmão é o órgão alvo da infecção por *P. aeruginosa* em doentes com FQ<sup>20</sup>. Esta bactéria apresenta múltiplos fatores de virulência, que conferem elevada resistência a antibióticos e permitem ultrapassar as defesas fisiológicas do hospedeiro, incluindo fatores secretados e celulares<sup>20</sup> como exotoxinas (Exo) (dos tipos A, S, T, U, Y), citotoxinas, elastase (Ela; ou pseudolisina), protease alcalina (AP), fosfolipase C, fenazinas, biofilmes<sup>8, 60, 71</sup>, entre outros. Os fatores de motilidade e adesão celular englobam os flagelos, *pili* e lipossacáridos<sup>51, 60</sup>.

*P. aeruginosa* secreta várias proteases que estão implicadas na sua patogenicidade<sup>72</sup>, incluindo endopeptidases como Ela e AP<sup>87, 88</sup>.

Ela trata-se de uma metaloendopeptidase de zinco com 33-kDa<sup>71, 87</sup>, secretada como preproenzima, clivada em propeptido na sua passagem pela membrana celular e rapidamente ativada por autoproteólise que, por sua vez, funciona como inibidor da enzima Ela<sup>71</sup>.

AP tem uma especificidade de clivagem alargada, no entanto não é tão potente como a Ela e não tem atividade elastolítica<sup>14, 71</sup>. Outra protease, *large extracellular protease* (LepA), ativa o fator nuclear kappa B, NF-kappaB, e aumenta a reação inflamatória<sup>73</sup>.

*P. aeruginosa* evidencia ainda a capacidade de suprimir a expressão proteica das células epiteliais e lisar as células hospedeiras através de exotoxinas como exotoxina

A (ExoA), uma proteína adenosina-5'-difosfato-ribosilante (ADP-ribosilante) <sup>29, 82, 126</sup>.

Os efetores do sistema de secreção tipo III (T3SS) são reconhecidos como chave para estabelecer a infecção <sup>14, 41</sup>, e incluem exotoxina S e exotoxina T, ambos com atividades ADP-ribosiltransferase e ativadores de guanosina-5'-trifosfato-hidrosilase (GTP-hidrolase). Os efetores T3SS atuam em conjunto para inibir a polimerização da actina, prevenir a fagocitose e migração celular, e, ainda para promover a apoptose <sup>9</sup>. Um outro efector T3SS é a exotoxina Y que altera a polimerização da actina e aumenta a permeabilidade da membrana <sup>91</sup>. Quanto à exotoxina U, sendo uma fosfolipase, poderá provocar lesões da membrana e lise celular, e ainda modular a resposta inflamatória <sup>4, 29</sup>.

Em conjunto, estas proteínas alteram a superfície epitelial do pulmão, provocando disrupção da polaridade e lesão celulares, e prevenindo a endocitose e *clearance* de *P. aeruginosa* <sup>42</sup>, o que contribui para o estabelecimento da infecção a este nível.

A estase ciliar é também promovida por ramnolípidos, uma mistura de surfactantes secretados <sup>106</sup>. As fenazinas, moléculas com potencial *redox*, contribuem na defesa de *P. aeruginosa* contra o hospedeiro e como parte da cadeia respiratória terminal. Estas moléculas têm um impacto negativo nos processos das células eucarióticas, tais como na respiração, transporte celular e expressão génica <sup>102</sup> e estão descritas a sua relação com um pior prognóstico em FQ <sup>66</sup>.

Além dos fatores acima descritos, ocorre ainda uma diminuição da produção do óxido nítrico, uma das moléculas antibacterianas do hospedeiro, o que pode contribuir para a suscetibilidade pulmonar e o início da infecção bacteriana. Nas células epiteliais das vias aéreas de doentes com FQ, existe também o aumento dos locais de ligação bacterianos (ex. asialo GM1) <sup>51, 99</sup>.

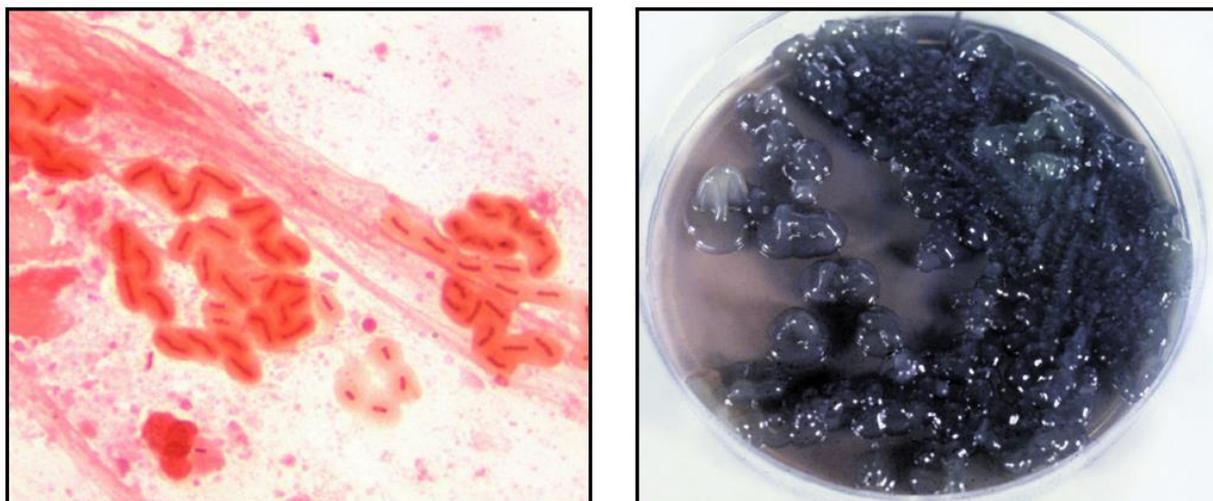
Após a invasão do pulmão por *P. aeruginosa*, e consequente inibição da *clearance* pulmonar, ocorrem alterações que induzem a redução da ativação imune e dos mecanismos de obstrução à *clearance*. Por outro lado, para facilitar a penetração no muco, *P. aeruginosa* utiliza as enzimas secretórias, exoproteínas, para travar a imunidade do hospedeiro <sup>14, 42, 77</sup>.

Após o doente ser infetado, a resposta inflamatória excessiva do pulmão de doentes com FQ contribui para a incapacidade do hospedeiro em erradicar a infeção. Em resposta ao aumento da produção de interleucina-8 e leucotrieno B4, os neutrófilos infiltram o pulmão onde libertam mediadores como a Ela, que inibem ainda mais as defesas do hospedeiro, interferem com a opsonofagocitose, alteram a *clearance* mucociliar, e danificam a arquitetura da parede das vias aéreas. A combinação destes eventos favorece a persistência das bactérias nas vias aéreas <sup>51, 99</sup>.

Até existir uma cura para a doença, a melhor esperança para limitar a lesão aos tecidos hospedeiros e prolongar a sobrevivência é a investigação de terapias que aliviem a obstrução, controlem a infeção e atenuem a inflamação <sup>51, 99</sup>.

Um dos fatores patogénicos mais importantes de *P. aeruginosa* é a sua capacidade de formar biofilme na superfície pulmonar do hospedeiro com FQ <sup>21</sup> e sobre-expressar alginato, transformando as estirpes em mucoides <sup>74</sup>.

Na figura 1 podem-se observar estirpes mucoides de *P. aeruginosa* <sup>101</sup>.



**Figura 1** – Imagem à esquerda: preparação com coloração de Gram de estirpe mucoide de *P. aeruginosa*, obtida a partir da expetoração de um doente com FQ, demonstrando características distintivas de material de alginato alaranjadas que rodeiam e separam cada bacilo de Gram negativo (imersão de óleo x 1 000). Imagem à direita: placa de agar de MacConkey com crescimento de uma estirpe mucoide clássica de *P. aeruginosa*. Após alguns dias, este material iria preencher a placa de Petri e espalhar-se para as porções dependentes da placa, tal como a tampa, quando armazenado com a face do agar para cima (Adaptado de Pritt *et al.* <sup>101</sup>).

O biofilme surge a partir do aumento de produção do mucopolissacárido alginato, o que, por sua vez, estimula a produção de mucina e forma uma barreira que limita o reconhecimento imune e *clearance* da bactéria <sup>21</sup>. Deste modo, confere proteção contra a penetração das defesas do hospedeiro, bem como contra a penetração de antibióticos <sup>30, 92</sup>.

A expressão de todos os fatores de virulência é crítica para o estabelecimento e manutenção da infeção pulmonar por *P. aeruginosa*, bem como para evitar a sua *clearance* no processo de infeção precoce, permitindo evolução da primoinfeção para infeção intermitente, e posteriormente, para infeção crónica <sup>36, 51</sup>. Durante o processo de infeção pulmonar crónica em doentes com FQ, muitos destes fatores são perdidos, em parte, para evitar o reconhecimento e reduzir a ativação do inflamassoma <sup>36, 93, 120</sup>. Esta perda reflete a adaptação da bactéria ao ambiente pulmonar e à transição para a

cronicidade<sup>36, 93</sup>. Consequentemente, na infeção pulmonar crónica, os isolamentos de *P. aeruginosa* não apresentam as características inflamatórias bacterianas mais comuns como flagelos e *pili*, e inibem mecanismos de virulência como o T3SS<sup>60</sup>.

Recentemente, foram identificados amiloides funcionais de *P. aeruginosa* que estão associados ao aumento de agregação e formação de biofilme na superfície pulmonar. Para além de funcionarem como componentes estruturais do biofilme, a sua presença induz alterações *major* na conformação do proteoma bacteriano, incluindo a menor quantidade de fatores de virulência clássicos, como Ela B e secreção de AP<sup>59</sup>.

### 1.2.2 - Infeção pulmonar de *P. aeruginosa* em doentes com FQ

A doença pulmonar crónica é a principal responsável pela morbilidade e mortalidade na FQ, caracterizando-se pela obstrução das vias aéreas, infeção bacteriana crónica e resposta inflamatória excessiva<sup>99</sup>.

Os doentes com FQ podem ser infetados precocemente na vida, por um espectro limitado de bactérias<sup>99</sup>. Em regra, *S. aureus* é o primeiro agente patogénico a colonizar o trato respiratório<sup>26, 110</sup>. Este microrganismo é o mais frequentemente identificado nas secreções brônquicas de lactentes e crianças que não estejam sob profilaxia antiestafilocócica<sup>34, 53, 110</sup>, atingindo uma prevalência superior a 50% aos 10 anos de idade<sup>12, 53, 110</sup>. Na era pré-antibiótica, *S. aureus* fora responsável pela morte da maioria das crianças com FQ<sup>34, 110</sup>, e atualmente a persistência da infeção crónica pode levar a lesão pulmonar progressiva<sup>68</sup>. A coinfeção de *P. aeruginosa* com *S. aureus*, bem como com outros microrganismos, é comum<sup>26, 54</sup>.

Atualmente, o agente patogénico mais frequente que causa infeção pulmonar crónica em doentes com FQ é *P. aeruginosa*, contribuindo para o ciclo de inflamação-infeção já descrito<sup>37, 39, 99</sup>.

A colonização por um agente pode ser definida como a presença do microrganismo no hospedeiro sem que provoque uma resposta imune específica, infeção ou efeito adverso<sup>94</sup>. A infeção pode ser definida como a deposição, colonização e multiplicação de um microrganismo num hospedeiro, geralmente acompanhada por uma resposta do mesmo<sup>43</sup>. Apesar da controvérsia existente entre a definição de colonização e infeção por *P. aeruginosa* em FQ, optou-se neste trabalho por considerar estes conceitos como sobreponíveis, o que é sustentado também por outros autores<sup>69, 121</sup>.

A infeção pulmonar por *P. aeruginosa* inicia-se precocemente na infância, ocorrendo em 10 a 30% dos doentes com um ano de vida<sup>18, 53, 81</sup>. A prevalência desta infeção aumenta progressivamente durante a infância, sobretudo a partir dos 6-10 anos<sup>26, 50</sup>, e atinge os 70-80% na adolescência e idade adulta<sup>12, 26, 53, 81</sup>.

Após uma média de 11 anos a partir da infeção inicial por *P. aeruginosa*<sup>39</sup>, as estirpes não mucoides, que são responsáveis pela infeção intermitente, sofrem transformação em estirpes mucoides que provocam infeção crónica. Esta infeção, virtualmente, poderá nunca ser erradicada. Tal deve-se às características do pulmão de doentes com FQ e às mutações e aos mecanismos de adaptação do microrganismo a este tipo de pulmão, incluindo a formação de biofilme difícil de penetrar pelos antibióticos<sup>60, 81</sup>. O estabelecimento da infeção crónica está associado a agravamento clínico, radiológico e da função respiratória, o que confere mau prognóstico para o doente<sup>81</sup>.

A prevenção, deteção e terapêutica precoces da infeção por *P. aeruginosa* são, assim, cruciais. Para atingir estes objetivos são necessários uma monitorização

clínica e microbiológica regular, drenagem de secreções e uso precoce de antibióticos<sup>34</sup>.

Atualmente, a terapêutica antibiótica atempada na infecção precoce, na tentativa de erradicar, é o tratamento de referência, visto que a profilaxia antibiótica não está recomendada<sup>34</sup>. É possível prevenir a infecção crônica por *P. aeruginosa* em 80% dos doentes com infecção intermitente através da implementação de regimes antibióticos adequados<sup>48, 100</sup>. A infecção crônica poderá apenas ser controlada com o uso de antibióticos a longo prazo, permitindo controlar a função pulmonar e melhorar o prognóstico<sup>48, 49, 100</sup>.

A detecção rápida da infecção precoce é da maior importância para o prognóstico dos doentes com FQ, na medida em que o tratamento atempado pode prevenir ou atrasar a lesão pulmonar irreversível<sup>40</sup>.

### 1.2.3 - Resposta imunitária do hospedeiro com FQ

A infecção por *P. aeruginosa* induz uma rápida produção de anticorpos (Ac) relativa a um grande número de antígenos (Ag) bacterianos<sup>67</sup>. A resposta imune humoral contra *P. aeruginosa* depende de vários fatores, como o estado imunitário do hospedeiro, uso de corticóides, uso de terapêutica antibiótica dirigida e fatores relacionados com o próprio microrganismo<sup>17, 64, 67</sup>.

A marcada variabilidade individual<sup>105</sup>, na resposta aos Ag de *P. aeruginosa*, poderá também estar relacionada com os mecanismos de regulação imunitária resultando em diferentes razões entre as células T ajudantes do tipo 1 e as células T ajudantes do tipo 2 (Th1/Th2), que determinam os níveis de Ac<sup>89</sup>. Como consequência da

presença de *P. aeruginosa* ou dos seus produtos nas vias aéreas de doentes com FQ, surge uma reação de hipersensibilidade tipo III, que se caracteriza pela produção de Ac específicos contra vários Ag bacterianos, formação de imunocomplexos e fluxo de neutrófilos do sangue para o lúmen das vias aéreas <sup>37, 63</sup>. Esta reação leva à destruição tecidual endobrônquica consequente e contribui para a inflamação pulmonar crónica <sup>37</sup>.

Dada a cronicidade da infeção pulmonar bem como as infeções recorrentes, há hipergamaglobulinémia <sup>58</sup> e existe formação de Ac citoplasmáticos antineutrofílicos <sup>13</sup>. Num estudo realizado em crianças com FQ, cujo diagnóstico havia sido realizado através de rastreio neonatal, foi detetada uma ordem temporal de aparecimento dos Ac contra os Ag específicos testados em doentes infetados: Ac anti-ExoA, seguidos de Ac antilisos celulares e posteriormente Ac anti-Ela. Esta evolução temporal pode representar a produção sequencial destes antigénios durante a evolução da infeção pulmonar por *P. aeruginosa* <sup>123</sup>.

#### 1.2.4 - Deteção da infeção por *P. aeruginosa*

O exame microbiológico (cultura) das secreções respiratórias das vias aéreas inferiores (lavado bronco-alveolar, LBA; ou expetoração) realizado regularmente é usado como método de referência para o diagnóstico da infeção por *P. aeruginosa* <sup>40, 119</sup>.

O exame microbiológico pode também ser realizado em secreções orofaríngeas em crianças pequenas, nas quais é difícil obter expetoração <sup>34</sup>. No entanto, as culturas destas secreções não predizem com fiabilidade a presença de microrganismos

patogênicos nas vias aéreas inferiores de crianças pequenas com FQ <sup>6, 108</sup>. Devido a problemas de amostragem, mesmo a cultura negativa de um LBA, para um determinado microrganismo, não garante que este não esteja presente no pulmão do doente com FQ <sup>57</sup>. Surge, assim, a necessidade de utilizar diferentes marcadores de infecção que auxiliem a definir o estado de infecção por *P. aeruginosa*.

Existem outros métodos disponíveis, que permitem detetar a infecção por *P. aeruginosa*, como o método serológico que já é utilizado na prática clínica nos Estados Unidos e nalguns países europeus <sup>47, 67, 123</sup>. Mais recentemente, têm sido realizadas técnicas de amplificação genética para detetar *P. aeruginosa* a partir de amostras respiratórias de doentes com FQ, e que cujos dados revelam variada sensibilidade e especificidade <sup>31, 78, 83</sup>.

O método serológico deteta Ac anti-*P. aeruginosa*, que podem estar presentes mesmo antes do primeiro exame microbiológico positivo <sup>17, 86, 123</sup>. Os diferentes testes serológicos existentes utilizam diferentes Ac anti-*P. aeruginosa* e o painel ideal de Ag a utilizar permanece incerto <sup>38</sup>. Os métodos serológicos possuem valores geralmente elevados, embora variáveis, de sensibilidade (66,2-95,6%) bem como de especificidade (55,7-95,6%) <sup>27, 69, 100, 121</sup>.

Na prática clínica, o valor preditivo do positivo e o valor preditivo do negativo são os parâmetros mais relevantes para avaliar a capacidade preditiva do método relativamente à presença da infecção <sup>69</sup>, pois dependem da prevalência de *P. aeruginosa* numa determinada população e da idade dos doentes. Na maioria dos estudos recentes que utilizam diferentes Ac, o valor preditivo do positivo é elevado (até 97,1%) tal como o valor preditivo do negativo (até 99%) <sup>27, 69, 100</sup>.

Como vantagens, o método serológico permite detetar a infeção precoce por *P. aeruginosa*<sup>100</sup>, distinguir doentes não infetados de doentes infetados<sup>121</sup>, determinar o risco de evolução para infeção crónica<sup>100, 121</sup>, distinguir infeção intermitente de crónica na maioria dos doentes<sup>100</sup> e correlaciona-se com a gravidade da doença pulmonar<sup>105</sup>. Dado que este método permite estabelecer infeção provável<sup>86, 100</sup>, perante título elevado de Ac deve-se considerar iniciar terapêutica de erradicação, mesmo se o exame cultural for negativo numa fase inicial<sup>69, 125</sup>. Por outro lado, ao detetar a evolução da infeção intermitente para crónica, permite a prescrição de terapêutica antibiótica atempada para evitar esta evolução<sup>48</sup> ou a prescrição de terapêutica de manutenção no caso de cronicidade<sup>33, 48, 49, 100</sup>.

Os três antigénios de *P. aeruginosa*, AP, ELA e ExoA, possuem elevada imunogenicidade e são expressos por quase todas as estirpes de *P. aeruginosa*<sup>69</sup>.

O exame serológico comercial atualmente mais utilizado baseia-se no método desenvolvido por Döring e Høiby<sup>35</sup> e possui elevada sensibilidade (86,1%), elevada especificidade (95,6%), elevado valor preditivo do positivo (97,1%) e elevado valor preditivo do negativo (80,2%) e apresenta baixa variabilidade intra e interensaio<sup>69</sup>.

Dada a elevada capacidade discriminativa e preditiva da determinação de Ac na deteção da infeção precoce por *P. aeruginosa* e, tendo em conta que este método não tem sido utilizado em Portugal, pretendeu-se neste estudo fazer uma avaliação do método serológico em doentes com FQ.

Optou-se, neste trabalho, por adotar o teste serológico comercial desenvolvido por Döring e Høiby<sup>35</sup> por permitir detetar Ac IgG contra as três proteínas extracelulares major de *P. aeruginosa*, AP, Ela e ExoA.

Este é o primeiro estudo realizado em Portugal, ao que julgamos saber, que deteta a infeção por *P. aeruginosa* através da determinação de Ac em doentes com FQ.

## 2 - OBJETIVOS

---

O objetivo principal deste estudo foi avaliar o método serológico para diagnóstico de infecção por *P. aeruginosa* em crianças e adolescentes com FQ, considerando o exame cultural como teste diagnóstico de referência, avaliando a capacidade discriminativa do método serológico através do cálculo da sensibilidade e da especificidade, e a sua capacidade preditiva através do valor preditivo do positivo e do valor preditivo do negativo.

Pretendeu-se, também, realizar a comparação de características clínicas, incluindo fatores de gravidade clínica associados à infecção por *P. aeruginosa*, em doentes com FQ com determinação de Ac positiva e negativa para *P. aeruginosa*.

### 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

---

#### 3.1 - População-alvo

No presente estudo foram avaliados doentes do grupo pediátrico do Centro Especializado de FQ do HSM, com diagnóstico estabelecido de FQ com idade inferior ou igual a 18 anos.

O Centro Especializado de FQ do HSM é o maior centro de referência em Portugal e segue anualmente cerca de 100 doentes. Está subdividido numa consulta pediátrica e numa outra de adultos.

A opção de realizar este trabalho com crianças e adolescentes com FQ prendeu-se com a importância do início da infeção por *P. aeruginosa* na infância, atingindo taxas de prevalência na adolescência semelhantes às dos adultos, como anteriormente referido <sup>12, 18, 26, 50, 53, 81</sup>.

Obteve-se o consentimento informado por escrito dos pais (em doentes com idade inferior a 14 anos) ou dos pais e dos doentes (se idade igual ou superior a 14 anos), relativamente a todos os indivíduos incluídos no estudo. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do HSM - CHLN.

Os critérios de inclusão foram os seguintes:

- Doentes com diagnóstico de FQ com seguimento clínico regular, incluindo consultas com frequência mínima de três em três meses, no grupo pediátrico do Centro Especializado de FQ do HSM há pelo menos um ano;
- Realização de exames microbiológicos regulares no HSM, com frequência mínima de três em três meses;
- Consentimento informado escrito;
- Pelo menos uma amostra de soro colhida na consulta de revisão anual, momento em que se deu a entrada no estudo.

Os critérios de exclusão foram os seguintes:

- Realização de exames microbiológicos fora do HSM;
- Seguimento clínico irregular no HSM;
- Doentes imunodeprimidos, incluindo doentes recetores de transplante pulmonar ou hepático, sob imunossupressão.

### **3.2 - Desenho do estudo**

Nesta avaliação foi realizado um estudo retrospectivo transversal, cujos doentes foram incluídos em 2011. Durante este ano realizou-se a recolha de amostras de soro para determinação de Ac anti-*P. aeruginosa* (uma amostra por cada doente).

A entrada no estudo ocorreu, para cada doente, no momento em que foi dado consentimento informado escrito e, simultaneamente, foi colhida a amostra de soro

para determinação de Ac anti-*P. aeruginosa*, o que ocorreu maioritariamente na consulta de revisão anual.

Foram analisados os resultados dos exames microbiológicos das secreções respiratórias dos 12 meses prévios à entrada no estudo, constituídos em média por quatro amostras por cada doente (de acordo com o protocolo clínico do Centro de FQ do HSM).

Os dados clínicos, do ano anterior ao da colheita de amostras para exame serológico, foram recolhidos através da consulta do processo clínico dos doentes.

### **3.3 - Amostragem e recrutamento**

No presente estudo foi utilizada uma amostra de conveniência constituída por todos os doentes com diagnóstico de FQ, seguidos regularmente no grupo pediátrico do Centro Especializado de FQ do HSM entre 2010 e 2011, com e sem infeção por *P. aeruginosa*, e que satisfizeram os critérios de inclusão.

A amostra ficou constituída por 37 doentes, correspondendo a 66,1% dos 56 doentes com FQ do grupo pediátrico do HSM em seguimento no período de estudo.

O recrutamento foi efetuado através do esclarecimento e pedido de entrada no estudo realizado em colaboração com o médico assistente durante a consulta de revisão anual no Centro de FQ.

### **3.4 - Serologia**

O soro para determinação de Ac anti-*P. aeruginosa* (2-3 mL) foi obtido através de sangue colhido por punção venosa na altura das análises de vigilância dos doentes com FQ, que fazem parte dos cuidados assistenciais regulares e que são requisitados, no mínimo, uma vez por ano na consulta de revisão anual (de acordo com o protocolo de seguimento do Centro de FQ do HSM).

O exame serológico foi realizado recorrendo ao teste comercial Mediagnost anti-*Pseudomonas aeruginosa* IgG EIA, E15 (Mediagnost®, Reutling, Alemanha).

#### *3.4.1 - Breve descrição do teste*

O teste comercial Mediagnost anti-*Pseudomonas aeruginosa* IgG EIA, E15, é um imunoensaio enzimático de imunoglobulina G (IgG) (Protocolo acessível em [http://mediagnost.de/wp-content/uploads/2014/02/E15\\_de.pdf](http://mediagnost.de/wp-content/uploads/2014/02/E15_de.pdf)).

As amostras de soro foram diluídas e adicionadas aos Ag de *P. aeruginosa* AP, Ela ou Exo. Os Ac específicos na amostra ligaram-se aos Ag presentes durante a incubação de 2 horas a 37°C. Após lavagem, o conjugado (IgG anti-humana marcada com peroxidase) foi adicionado e incubado novamente (2 horas a 37°C). Após a lavagem final, o substrato foi adicionado e incubado por mais 30 minutos à temperatura ambiente. A reação foi terminada com a adição da solução stop acompanhada pela alteração da cor azul para amarela, sendo o resultado

posteriormente lido por espectrofotometria (Microplate Reader, Model 680, Bio-Rad®).

A intensidade da cor da reação correspondeu à concentração dos Ac na amostra.

Para cada doente foi testada uma amostra de soro, tendo-se procedido a uma análise qualitativa e semiquantitativa. A deteção semiquantitativa do método subdividiu-se nas seguintes categorias de acordo com os títulos obtidos: negativa se título <1:500; *borderline* se título de 1:500 até 1:1250; positiva se título superior a 1:1250; crónica positiva se título superior a 1:10000.

Os títulos considerados *borderline* e elevados foram diluídos e novamente testados, de acordo com as instruções do fabricante, de modo a obter determinação de Ac considerada nas categorias negativa, positiva ou crónica positiva.

De acordo com a análise semiquantitativa, considerou-se um resultado positivo para Ac anti-*P. aeruginosa* quando na presença de pelo menos uma determinação positiva para um dos Ac contra AP, ELA ou ExoA, de acordo com os valores de *cut-off* recomendados pelo fabricante. A determinação de Ac foi considerada negativa quando não foi detetado qualquer Ac.

### **3.5 - Exame microbiológico de secreções respiratórias**

A colheita de secreções respiratórias (expetoração ou secreções nasofaríngeas profundas/aspirado laríngeo nas crianças não produtoras de expetoração) foi executada regularmente nas consultas de seguimento habituais destes doentes, com uma regularidade mínima de três em três meses (de acordo com o protocolo do Centro de FQ do HSM). As amostras biológicas foram transportadas no próprio dia e inoculadas, entre outros, em meio cultural de agar MacConkey e de agar cetrimida, no

laboratório de Microbiologia do HSM, realizando-se o exame cultural de acordo com a técnica de referência internacional<sup>10, 54</sup>.

Foram analisados os resultados dos exames culturais dos 12 meses anteriores à colheita da amostra de soro usada para o teste serológico. De acordo com a avaliação dos resultados culturais, foram definidos três grupos de doentes relativamente ao estado de infeção por *P. aeruginosa*, de acordo com Critério de Leeds modificado<sup>79, 80</sup>:

- Doentes com infeção crónica: isolamento de *P. aeruginosa* em mais de 50% dos exames culturais;
- Doentes com infeção intermitente: isolamento de *P. aeruginosa* em 50% ou menos dos exames culturais;
- Doentes livres de infeção: ausência de isolamento de *P. aeruginosa* nos exames culturais. Neste grupo, devido à dimensão da amostra, foram incluídos doentes em cujos exames culturais nunca haviam sido identificados *P. aeruginosa*, bem como doentes que já haviam tido isolamentos de *P. aeruginosa* previamente ao período do estudo.

### **3.6 - Dados clínicos**

Os dados clínicos, referentes aos 12 meses prévios à entrada no estudo, foram recolhidos através da consulta do processo clínico dos doentes.

Os dados recolhidos e analisados, incluíram:

- Género;

- Idade (anos);
- Idade (anos) ao diagnóstico de FQ;
- Genótipo – homozigotia F508del/F508del, heterozigotia F508del/outra mutação, outras mutações;
- Índice de massa corporal (IMC) ( $\text{Kg/m}^2$ ) em z-score de acordo com idade e género;
- Função pancreática – grupo de doentes com insuficiência pancreática (valor de elastase fecal inferior a 200  $\mu\text{g/g}$  fezes) e doentes sem insuficiência pancreática (elastase fecal superior ou igual a 200  $\mu\text{g/g}$  fezes);
- Função pulmonar – VEMS, CVF e FEF 25-75, em percentagem do previsto (%P) de acordo com idade e género;
- Infecção pulmonar por outros microrganismos;
- Duração do tratamento de FQ (em anos);
- Medicação com antibióticos anti-*P. aeruginosa* por via inalatória, há pelo menos três meses (colistina ou tobramicina);
- Número de internamentos e número de dias de internamento (nos 12 meses prévios à entrada no estudo).

### **3.7 - Análise estatística**

O processamento dos dados obtidos foi suportado pelos métodos de análise estatística adequados através do programa informático IBM® SPSS® versão 20.

A análise estatística apoiou-se em estatística descritiva e gráfica, simples e comparativa e estatística inferencial e ensaios de hipóteses. Os valores foram

representados em percentagem em variáveis categoriais e em mediana com intervalo de valores entre mínimo e máximo em variáveis em escala de medida métrica.

Para informação em tabelas de contingência foram usados os testes não-paramétricos: Qui-quadrado, Exato de Fisher e Exato de Fisher-Freeman-Halton (extensão do teste Exato de Fisher a tabelas de dimensão superior a 2x2). Quando as variáveis se apresentavam em escala de medida métrica aplicou-se o teste de Mann-Whitney ou o teste da Mediana, conforme a distribuição dos dados. Quando a significância de um teste foi inferior a 0,05 as diferenças amostrais foram consideradas estatisticamente significativas.

Neste trabalho, considerou-se infeção por *P. aeruginosa* no global quando este microrganismo foi detetado pelo menos uma vez nas secreções respiratórias através do exame microbiológico, durante os 12 meses prévios à entrada no estudo <sup>69</sup>.

A capacidade discriminativa inclui a sensibilidade e a especificidade do teste serológico (sensibilidade: probabilidade de detetar Ac anti-*P. aeruginosa* num doente que está infetado; especificidade: probabilidade de não se detetar Ac anti-*P. aeruginosa* num doente não está infetado por esta bactéria <sup>69</sup>).

A capacidade preditiva do teste inclui o valor preditivo do positivo e o valor preditivo do negativo (valor preditivo do positivo: probabilidade de um doente com determinação de Ac positiva estar realmente infetado por *P. aeruginosa*; valor preditivo do negativo: probabilidade de um doente com determinação de Ac negativa não estar infetado por *P. aeruginosa* <sup>69</sup>).

Os resultados da determinação de Ac anti-*P. aeruginosa* foram comparados com os resultados do exame cultural, para avaliar as propriedades diagnósticas do teste

serológico relativamente ao estado de infeção no global, infeção intermitente e infeção crónica (comparando com doentes sem infeção, neste últimos dois grupos). Estimaram-se, pontualmente, a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo do positivo e o valor preditivo do negativo, a exatidão (*accuracy*) e a concordância (*kappa*).

---

## 4 - RESULTADOS

---

### 4.1 - Caracterização da amostra

Dos 37 doentes incluídos no estudo, 59,5% eram doentes do género feminino. A mediana de idade foi de 10,8 anos [1,98;16,5 anos]. Da distribuição de doentes por idade, obteve-se o seguinte: cinco doentes apresentavam idade entre um ano e cinco anos; 13 doentes entre os seis e os 10 anos; 19 doentes entre os 11 e os 16 anos. Na amostra estudada, não houve nenhum doente com 17 anos nem com 18 anos.

Os doentes foram agrupados de acordo com o tipo de infeção por *P. aeruginosa*, pesquisada nas secreções respiratórias, obtendo-se o seguinte:

- Infeção crónica por *P. aeruginosa* em oito doentes (21,62%);
- Infeção intermitente por *P. aeruginosa* em 15 doentes (40,54%);
- Foram considerados livres de infeção por *P. aeruginosa* 14 doentes (37,84%) (três dos quais nunca haviam tido infeção documentada e 11 estavam livres de infeção nos últimos 12 meses).

A prevalência da infeção global por *P. aeruginosa* na amostra em estudo foi de 62,16%.

A distribuição do tipo de infeção por grupo etário, está representada no quadro 1.

**Quadro 1** - Tipo de infeção por *P. aeruginosa* de acordo com grupo etário.

Tipo de infeção	Grupo etário		
	1-5 anos	6-10 anos	11-16 anos
<b>Livre de infeção</b> (n=14)	40% (2/5)	38,5% (5/13)	36,8% (7/19)
<b>Infeção intermitente</b> (n=15)	60% (3/5)	46,1% (6/13)	31,6% (6/19)
<b>Infeção crónica</b> (n=8)	0	15,4% (2/13)	31,6% (6/19)

#### 4.2 - Método serológico

De acordo com o teste usado, 10 doentes apresentaram determinação positiva de Ac anti-*P. aeruginosa* e 27 apresentaram determinação negativa. Não houve nenhum doente com deteção de Ac considerada crónica positiva.

Nos 8 doentes com infeção crónica, a determinação de Ac foi positiva para os Ag AP, ELA e ExoA em 100%, 62,5% e 62,5%, respetivamente (Quadro 2). Os doentes com infeção intermitente apresentaram determinação de Ac positiva para ELA e ExoA em 6,7% para cada um destes Ag e nenhum apresentava para AP (Quadro 2). Em todos os doentes livres de infeção não foram detetados quaisquer Ac anti-*P. aeruginosa*.

**Quadro 2** - Deteção de Ac postiva de acordo com os diferentes Ag, por tipo de infeção.

Tipo de infeção	Ac anti- <i>P. aeruginosa</i> , por Ag		
	AP	ELA	ExoA
<b>Infeção crónica</b> (n=8)	100% (8)	62,5% (5)	62,5% (5)
<b>Infeção intermitente</b> (n=15)	0	6,7% (1)	6,7% (1)

A distribuição global do tipo de infeção de acordo com o teste serológico encontra-se representada no Quadro 3. Todos os doentes com infeção crónica apresentaram determinação positiva de Ac. Quanto aos doentes com infeção intermitente, verificou-se que 86,7% apresentaram determinação positiva de Ac. Os doentes considerados livres de infeção por *P. aeruginosa* apresentaram na totalidade determinação negativa de Ac.

**Quadro 3** - Determinação de Ac de acordo com o tipo de infeção por *P. aeruginosa*.

Determinação de Ac	Tipo de infeção por <i>P. aeruginosa</i>		
	Infeção crónica	Infeção intermitente	Livres de infeção
<b>Positiva</b> (n=10)	100% (8)	13,3% (2/15)	0
<b>Negativa</b> (n=27)	0	86,7% (13/15)	100% (14)

Do ponto de vista serológico, a maioria dos doentes com determinação positiva de Ac apresentou infeção crónica por *P. aeruginosa* (80%) e 20% apresentou infeção intermitente. Dos doentes com determinação de Ac negativa, cerca de metade apresentou infeção intermitente e 51,9% eram livres de infeção (Quadro 4).

**Quadro 4** - Tipo de infeção por *P. aeruginosa* de acordo com determinação de Ac.

	Determinação de Ac	
	Positiva	Negativa
<b>Infeção crónica</b> (n=8)	80% (8/10)	0
<b>Infeção intermitente</b> (n=15)	20% (2/10)	48,1% (13/27)
<b>Livres de infeção</b> (n=14)	0	51,9% (14/27)

As propriedades diagnósticas do método serológico foram analisadas relativamente à presença de infecção por *P. aeruginosa* no global (intermitente e crónica) (Quadro 5), infecção intermitente (Quadro 6) e infecção crónica (Quadro 7).

Relativamente à deteção de infecção global por *P. aeruginosa*, e no total dos três Ac, o método serológico apresentou especificidade de 100% e sensibilidade de 43,5% (concordância=0,368) (Quadro 5). O valor preditivo do positivo foi de 100% e o valor preditivo do negativo foi de 51,9% para infecção por *P. aeruginosa*. A exatidão do método foi de 64,8%. Discriminando individualmente pelos três Ac específicos detetados, os valores de sensibilidade e valor preditivo do negativo são inferiores. Estes parâmetros estão discriminados no Quadro 5, de acordo com Ag analisado e na globalidade dos testes.

**Quadro 5** - Exatidão diagnóstica do método serológico na infecção global por *P. aeruginosa*.

	Sensibilidade	Especificidade	Concordância	VPP	VPN	Exatidão
<b>AP</b>	34,8%	100%	0,288	100%	48,3%	59,4%
<b>ELA</b>	30,4%	100%	0,249	100%	46,7%	56,7%
<b>ExoA</b>	26,1%	100%	0,211	100%	45,2%	54%
<b>Total</b>	43,5%	100%	0,368	100%	51,9%	64,8%

VPP=valor preditivo do positivo, VPN=valor preditivo do negativo.

Na deteção da infecção intermitente por *P. aeruginosa*, no total o método serológico apresentou especificidade de 100% e sensibilidade de 13,3% (concordância=0,129) (Quadro 6). O valor preditivo do positivo foi de 100% e o valor preditivo do negativo foi de 51,9%. A exatidão do método foi de 55,2%.

**Quadro 6** - Exatidão diagnóstica do método serológico nos doentes com infeção intermitente.

	<b>Sensibilidade</b>	<b>Especificidade</b>	<b>Concordância</b>	<b>VPP</b>	<b>VPN</b>	<b>Exatidão</b>
<b>AP</b>	-	100%	0,00	-	48,3%	-
<b>ELA</b>	6,7%	100%	0,065	100%	50%	51,7%
<b>ExoA</b>	6,7%	100%	0,065	100%	50%	51,7%
<b>Total</b>	13,3%	100%	0,129	100%	51,9%	55,2%

VPP=valor preditivo do positivo, VPN=valor preditivo do negativo.

Na deteção da infeção crónica por *P. aeruginosa*, no total o método serológico apresentou especificidade de 100% e sensibilidade de 100% (concordância=1,0) (Quadro 7). Os valores preditivos do positivo e do negativo foram ambos de 100%, com exatidão de 100%.

**Quadro 7** - Exatidão diagnóstica do método serológico nos doentes com infeção crónica.

	<b>Sensibilidade</b>	<b>Especificidade</b>	<b>Concordância</b>	<b>VPP</b>	<b>VPN</b>	<b>Exatidão</b>
<b>AP</b>	100%	100%	1,0	100%	100%	100%
<b>ELA</b>	75%	100%	0,792	100%	87,5%	90,9%
<b>ExoA</b>	62,5%	100%	0,68	100%	82,4%	86,3%
<b>Total</b>	100%	100%	1,0	100%	100%	100%

VPP=valor preditivo do positivo, VPN=valor preditivo do negativo.

### 4.3 - Características clínicas de acordo com a determinação de Ac

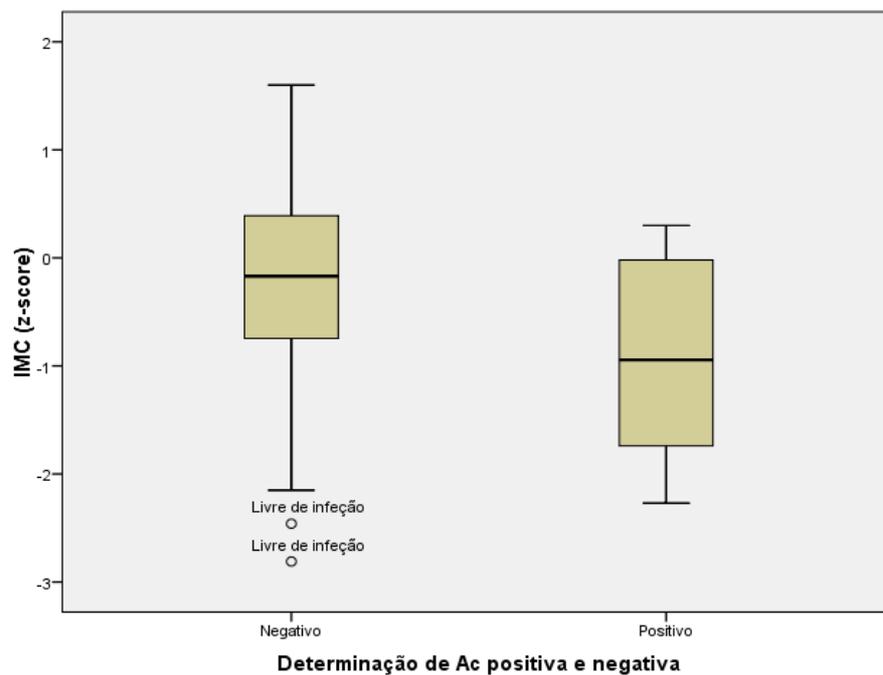
Das características analisadas, verificou-se que a distribuição de doentes por género foi semelhante entre doentes com determinação de Ac positiva e negativa, sendo que cerca de 60% dos doentes eram do género feminino em ambos os grupos, não havendo diferenças significativas (Quadro 8).

**Quadro 8** - Características clínicas de acordo com a determinação de Ac.

	Determinação de Ac		p
	Positiva	Negativa	
<b>Género</b> (n=37)			1,0 *
- Feminino	60% (6/10)	59,3% (16/27)	
- Masculino	40% (4/10)	40,7% (11/27)	
<b>Idade</b> (anos) (n=37)	11,7 [3,9;16,3]	10,7 [1,98;16,5]	0,837 ***
<b>Duração do tratamento</b> (anos) (n=37)	11,4 [1,4;14,3]	8,8 [1,95;16,25]	0,431 ***
<b>Genótipo</b> (n=37)			0,857 **
- F508del/F508del (n=23)	70% (7/10)	59,3% (16/27)	
- F508del/outra mutação (n=11)	30% (3/10)	29,6% (8/27)	
- Outras mutações (n=3)	0	11,1% (3/27)	
<b>Insuficiência pancreática</b> (n=31)	100%	77,8% (21/27)	0,162 *
<b>IMC</b> (z-score) (n=37)	-0,95 [-2,3;0,3]	-0,17 [-2,8;1,6]	0,045 ***
<b>Doentes internados</b> (n=8)			
- Nº total de dias de internamento	33,5 [6;118]	15,5 [6;34]	#
<b>Antibiótico anti-<i>P. aeruginosa</i></b> (n=18)	40% (4/10)	53,8% (14/16)	0,457 ****

IMC=Índice de Massa Corporal; \* Teste exato de Fischer; \*\* Teste de Fischer-Freeman-Halton; \*\*\* Teste de Mann-Whitney; \*\*\*\* Teste do Qui-quadrado; # amostra insuficiente para análise comparativa.

A mediana de z-score de IMC foi significativamente inferior nos doentes com determinação de Ac positiva: z-score de -0,95 [-2,3;0,3] versus -0,17 [-2,8;1,6] nos doentes com deteção negativa ( $p=0.045$ ). No grupo de doentes com determinação de Ac negativa, os dois doentes com menor z-score de IMC estavam livres de infeção por *P. aeruginosa* (Quadro 8, Figura 2).



**Figura 2** - IMC de acordo com determinação serológica.

Quanto a outras características clínicas, verificou-se relativamente à duração do tratamento, genótipo e função pancreática (Quadro 8) não existirem diferenças significativas entre os dois grupos. No entanto, o número total de anos de tratamento foi superior nos doentes com determinação de Ac positiva. Todos os doentes com determinação de Ac positiva apresentavam insuficiência pancreática. A maioria dos doentes apresentava, em ambos os grupos, homozigotia para a mutação F508del

(70% no grupo com determinação positiva e 59,3% no grupo com determinação negativa). Dos doentes com determinação positiva de Ac anti-*P. aeruginosa*, nenhum apresentava outras mutações de CFTR (Quadro 8).

Durante o período em estudo foram internados 8 doentes (21,6%) (Quadro 8). Verificou-se que 8,1% (n=3) dos doentes foram internados uma vez e 13,5% (n=5) foram internados pelo menos duas vezes. Os quatro doentes com determinação de Ac positiva que foram internados, registaram em conjunto 13 internamentos, com mediana do número de dias de internamento de 33,5 dias [6;118]. Os doentes internados com determinação de Ac negativa totalizaram 10 internamentos e apresentaram uma mediana do número total de dias de internamento de cerca de metade (15,5 dias [6;34]).

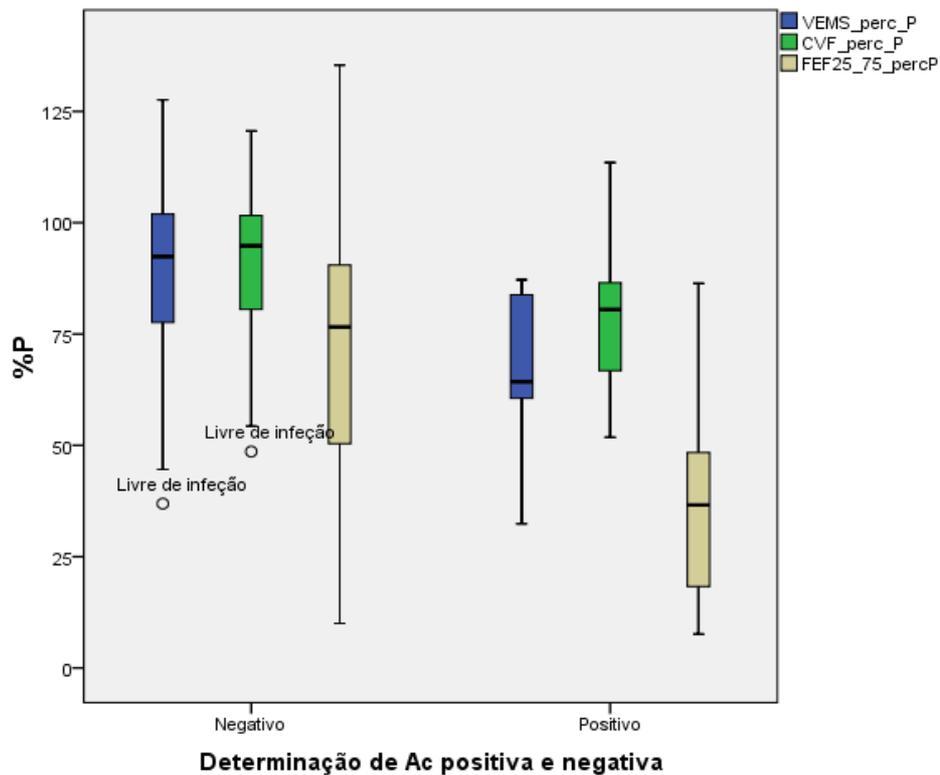
Dos doentes incluídos no estudo, 18 estavam medicados há pelo menos três meses com antibióticos anti-*P. aeruginosa* por via inalatória, não se verificando diferença significativa entre doentes com determinação de Ac positiva ou negativa.

Relativamente aos parâmetros da função respiratória analisados, verificou-se que a mediana do VEMS (%P) foi significativamente inferior nos doentes com determinação de Ac positiva (64,3%P [32,4;87,2] *versus* 92,4%P [36,9;127,6]; p=0,049) (Quadro 9; Figura 3). A mediana de FEF25-75 (%P) foi também significativamente inferior em doentes com determinação de Ac positiva: 36,6%P [7,6;86,4] *versus* 76,6%P [10;135,4] (p=0,034). Não se verificaram diferenças significativas relativamente à CVF. Os dois doentes com menor valor de VEMS e de CVF no grupo com deteção de Ac negativa, pertenciam ao grupo de doentes livres de infeção por *P. aeruginosa*.

**Quadro 9** - Função respiratória de acordo com a determinação de Ac (n=32).

Parâmetros da função respiratória	Determinação de Ac		
	Positiva	Negativa	p
<b>VEMS (%P)</b>	64,3 [32,4;87,2]	92,4 [36,9;127,6]	0,049 *
<b>CVF (%P)</b>	80,5 [51,8;113,5]	91,6 [48,6-120,6]	0,126 **
<b>FEF25-75 (%P)</b>	36,6 [7,6-86,4]	76,6 [10-135,4]	0,034 **

CVF=Capacidade vital forçada; FEF 25-75=Fluxo expiratório forçado entre 25% e 75% da CVF; VEMS=Volume expirado máximo por segundo; \* Teste da mediana; \*\* Teste de Mann-Whitney.



**Figura 3** - Função respiratória de acordo com serologia.

Quanto à avaliação da infecção crónica por outros microrganismos, nos doentes em estudo, os agentes encontrados com maior frequência foram *S. aureus* e *H. influenzae* (Quadro 10). Em cada grupo com determinação de Ac positiva e negativa

verificou-se um doente com infeção crónica por MRSA. A distribuição entre grupos não foi significativamente diferente. Apenas se verificou infeção crónica por BCC e por *H. parainfluenzae* no grupo de doentes com determinação de Ac negativa.

De acordo com os exames culturais analisados, nenhum dos doentes em estudo apresentava infeção crónica por outras bactérias, por *Aspergillus spp* ou por micobactérias.

**Quadro 10** - Coinfeção crónica, de acordo com a determinação de Ac (n=37).

Infeção crónica	Determinação de Ac		p
	Positiva	Negativa	
<b><i>S. aureus</i></b>	40% (4/10)	51,9% (14/27)	0,714 *
<b><i>H. influenzae</i></b>	0	29,6% (8/27)	0,079 *
<b>MRSA</b>	10% (1/10)	3,7% (1/27)	0,473 *
<b><i>H. parainfluenzae</i></b>	0	7,4% (2/27)	1,0 *
<b>BCC</b>	0	7,4% (2/27)	1,0 *

BCC=complexo *Burkholderia cepacia*; MRSA=*S. aureus* resistente à metilina; \* Teste exato de Fischer.

## 5 - DISCUSSÃO

---

A FQ é uma doença multissistêmica rara <sup>12, 104</sup>, cujo prognóstico depende principalmente da inflamação e infecção pulmonares crônicas <sup>37, 39, 104</sup>. *P. aeruginosa* trata-se do agente patogénico crónico mais frequente a partir da adolescência <sup>26</sup> que causa lesão estrutural e deterioração funcional do pulmão, conferindo ao doente mau prognóstico <sup>76, 81</sup>.

O avanço nas opções terapêuticas disponíveis contribuiu para a melhoria do prognóstico da FQ, incluindo a existência de novos antibióticos <sup>26, 75, 104</sup>. Pela necessidade de utilizar outro método de diagnóstico para detetar a infecção precoce por *P. aeruginosa* em doentes com FQ, foi desenvolvido o teste serologia que já é utilizado a nível internacional <sup>47, 67, 123</sup>. Para além das vantagens descritas na introdução, a determinação positiva de Ac pode ser usada para a definição de infecção crónica por *P. aeruginosa* <sup>67, 99</sup> pois reflete a resposta imune do hospedeiro à presença deste organismo patogénico.

Na deteção da infecção por *P. aeruginosa* no global, os nossos resultados de especificidade e valor preditivo do positivo (ambos de 100%) revelaram ser superiores aos de estudos semelhantes que utilizaram o mesmo teste serológico. O nosso valor obtido de especificidade, apesar de superior foi quase sobreponível ao de Kapler *et al* <sup>69</sup> e aproximadamente o dobro do valor obtido por Daines *et al* <sup>27</sup>. O valor preditivo do positivo foi sobreponível no estudo de Kapler *et al* <sup>69</sup>, embora ligeiramente inferior ao nosso, e Daines *et al* <sup>27</sup> obtiveram um valor cerca de 1/4 do nosso.

No entanto, os nossos valores obtidos de sensibilidade (43,5%) e de valor preditivo do negativo (51,9%) foram inferiores aos dos estudos referidos <sup>27, 69</sup>. O nosso valor de sensibilidade correspondeu a cerca de metade do valor obtido por Kapler *et al* <sup>69</sup> e a 2/3 do valor de sensibilidade no estudo de Daines *et al* <sup>27</sup>. O valor preditivo do negativo obtido no nosso estudo revelou ser inferior em cerca de 1/3 relativamente aos valores obtidos nestes dois estudos <sup>27, 69</sup>. O estudo de Kapler *et al* <sup>69</sup> envolvia doentes com um grupo etário mais alargado (0-40 anos), enquanto que no estudo de Daines *et al* <sup>27</sup> a dimensão da amostra era muito superior (n=582) e constituída por doentes somente até aos 12 anos de idade, inclusivé <sup>27</sup>.

Num estudo prospetivo, utilizando o mesmo teste serológico comercial, obtiveram-se resultados de especificidade e valor preditivo do positivo sobreponíveis aos do presente trabalho, embora também ligeiramente inferiores em cerca de 10% <sup>105</sup>. O valor de sensibilidade e o valor preditivo do negativo revelaram ser aproximadamente 92%, correspondendo ao dobro dos nossos <sup>105</sup>. Tal facto pode dever-se ao desenho do estudo, bem como à amostra de doentes, incluindo diferenças no grupo etário analisado (idades compreendidas entre um e 52 anos) e na dimensão da amostra que foi superior (n=375) <sup>105</sup>. Outro estudo recente, que também analisou amostras serológicas de crianças e jovens, revelou inferior valor preditivo do positivo, correspondendo a 3/4 daquele por nós obtido, e valor preditivo do negativo superior ao nosso em 1/3 <sup>70</sup>. No entanto, a metodologia utilizada foi díspar por se tratar de um estudo prospetivo <sup>70</sup>.

Noutros trabalhos foram descritos valores de especificidade e valor preditivo do positivo também inferiores aos nossos, respetivamente uma especificidade de 66% <sup>38</sup> a 87% <sup>100</sup> da nossa, bem como valores preditivos do positivo de 37% <sup>38</sup> a 84% <sup>100</sup> do

nosso. Nestes estudos, os valores de sensibilidade e os valores preditivos do negativo foram igualmente superiores aos nossos. A sensibilidade obtida no trabalho de Pressler *et al*<sup>100</sup> foi mais do dobro da nossa, e Douglas *et al*<sup>38</sup> obteve um valor superior em 2/3. O valor preditivo do negativo por nós obtido correspondeu a cerca de metade dos valores destes mesmos estudos<sup>38, 100</sup>. Mais uma vez, os dois últimos trabalhos não são comparáveis com o presente estudo, pois neles foram utilizados outros métodos serológicos, diferentes Ag de *P. aeruginosa* e doentes de grupos etários díspares<sup>38, 100</sup>, bem como diferentes amostras de secreções respiratórias<sup>38</sup>.

A existência de uma metodologia, aplicada ao nosso estudo em particular, e a presença de doentes pertencentes a uma determinada faixa etária dificultam a generalização dos nossos resultados a outras populações, com prevalência de infecção e idades diferentes.

Na prática clínica, a questão mais importante é determinar a capacidade preditiva do teste, que tem em consideração a prevalência da infecção pelo microrganismo na população estudada e que por sua vez está relacionada com a idade dos doentes. Ou seja, perante um doente com detecção de Ac positiva, qual a probabilidade de este doente estar realmente infetado por *P. aeruginosa*; bem como, perante um doente com determinação de Ac negativa, qual a probabilidade do doente não estar infetado<sup>69?</sup>

Os resultados obtidos no grupo de doentes com infecção intermitente, no que se refere à capacidade discriminativa e preditiva do método serológico na detecção da infecção intermitente por *P. aeruginosa*, mostraram elevada especificidade (100%) e elevado valor do preditivo do positivo (100%), mas baixa sensibilidade (13,3%) e baixo valor

preditivo do negativo (51,9%). Neste grupo, mais de metade dos doentes com infeção intermitente não apresentou Ac anti-*P. aeruginosa*. De um modo semelhante, no estudo transversal patente no trabalho de Kapler *et al*<sup>69</sup> metade dos doentes com infeção intermitente apresentaram determinação de Ac negativa. Na avaliação prospetiva também realizada pelo mesmo autor, nove desses doentes mantiveram-se sem infeção e três apresentaram infeção crónica por *P. aeruginosa*<sup>69</sup>.

Assim, no presente estudo o método serológico apresentou valores baixos de sensibilidade e de valor preditivo do negativo na deteção da infeção por *P. aeruginosa* no global e na infeção intermitente. Tal pode dever-se, em parte, ao fato de nos termos baseado apenas num estudo transversal.

Por outro lado, e como já referido, pode ser difícil obter amostras de secreções respiratórias adequadas em crianças com FQ de modo a realizar a deteção de infeção por *P. aeruginosa* utilizando o método de referência<sup>34, 40, 57, 119</sup>.

Ao utilizar a determinação de Ac na prática clínica, seria desejável poder distinguir doentes com infeção intermitente de doentes com infeção crónica e de doentes livres de infeção. Com o intuito de realizar uma avaliação mais adequada do valor do método serológico no diagnóstico da infeção precoce por *P. aeruginosa* em doentes com infeção intermitente, seria necessário proceder a um seguimento microbiológico, serológico e clínico. A determinação positiva de Ac pode determinar o risco de evolução para a infeção crónica por anti-*P. aeruginosa*, tal como demonstrado em estudos prévios<sup>48, 100</sup>. Assim, se no nosso estudo tivesse havido um seguimento, nos dois doentes com determinação de Ac positiva e infeção intermitente, poder-se-ia, talvez, ter verificado infeção crónica por *P. aeruginosa* no ano imediatamente

posterior à determinação de Ac. Se tal facto se verificasse, poderia permitir ponderar a introdução ou intensificação de antibioticoterapia anti-*P. aeruginosa*<sup>33, 48, 49, 100</sup>.

No grupo de doentes com FQ com infeção crónica por *P. aeruginosa*, a capacidade diagnóstica do método serológico demonstrou valor de 100% para os parâmetros de especificidade, sensibilidade, valor preditivo do positivo e valor preditivo do negativo, com exatidão de 100%. Estes valores são superiores aos previamente descritos relativamente à deteção da infeção por *P. aeruginosa* no global<sup>27, 38, 69, 70, 105</sup>.

Relativamente a um trabalho que se refere especificamente a este método de deteção na infeção crónica por *P. aeruginosa*, os nossos resultados apresentaram valores de ordem superior, quer em sensibilidade, quer em especificidade, como se pode verificar no estudo de Tramper-Stranders *et al*<sup>121</sup> em que a sensibilidade foi de 96% e a especificidade foi de 79%.

No nosso grupo de doentes com infeção crónica, todos os indivíduos apresentaram determinação de Ac positiva. Destaca-se o facto de que foi detetado Ac anti-AP em todos estes doentes, o que não se verificou nos estudos prévios que utilizaram os mesmos Ag no método serológico<sup>27, 69, 70, 105, 121</sup>.

Por outro lado, no presente estudo, a maioria dos doentes com infeção intermitente por *P. aeruginosa* (88,7%) apresentou determinação de Ac negativa. Em apenas dois doentes (13,3%) foram detetados Ac anti-*P. aeruginosa* e em nenhum destes foi detetado Ac anti-AP. Apesar da dimensão da amostra ser pequena, o Ac AP foi o mais específico na infeção crónica e não foi detetado nos doentes com infeção intermitente com determinação de Ac positiva, o que pode significar que AP talvez seja o Ag mais imunogénico na nossa população em estudo.

No grupo de doentes livres de infeção por *P. aeruginosa*, foram incluídos três doentes que nunca haviam tido infeção por *P. aeruginosa* e 11 doentes com infeção prévia por *P. aeruginosa* (que ocorrera antes dos 12 meses que antecederam a entrada no estudo). No entanto, e apesar do seu estado prévio de infeção, todos os doentes deste grupo apresentaram determinação de Ac negativa. Este facto vem reforçar a importância da serologia no seguimento clínico dos doentes, pois mesmo os doentes com infeção prévia por *P. aeruginosa*, e que no estudo estavam livres de infeção, apresentaram determinação negativa de Ac. Perante um doente com determinação de Ac negativa, é provável que o estado livre de infeção o seja, de facto, nessa altura (e não apenas um estado de infeção intermitente, por exemplo).

Os resultados do método serológico, por si só, não permitem determinar se a deteção de Ac positiva corresponde a infeção residual por *P. aeruginosa*, ou se é precursora de infeção <sup>5</sup>, podendo ser necessário um seguimento microbiológico e serológico em conjunto para avaliar esta questão.

Relativamente à avaliação de fatores clínicos, associados à infeção por *P. aeruginosa*, os nossos resultados mostraram que a maioria dos doentes com determinação de Ac positiva apresentou significativamente pior função respiratória (valores significativamente inferiores de VEMS e FEF25-75, e inferior CVF) e pior estado nutricional (menor z-score de IMC). Todos os doentes com determinação de Ac positiva apresentaram insuficiência pancreática bem como presença da mutação F508del, sendo a maioria deles homocigóticos para esta mutação. O número total de dias de internamento foi também superior neste grupo.

Estes resultados pareceram-nos espectáveis, visto que a maioria (88,2%) dos doentes com determinação positiva de Ac apresentava infeção crónica por *P. aeruginosa*. Tal como descrito na literatura, estes doentes apresentaram fatores de gravidade clínica, incluindo maior número de internamentos, e evidenciaram pior função respiratória<sup>11</sup> e pior estado nutricional, avaliado através do z-score do IMC<sup>76, 81</sup>.

Relativamente a outros fatores que podem influenciar o curso clínico da doença, como a idade mais avançada dos doentes, o número de anos de tratamento, ou a presença de coinfeção por outros microrganismos patogénicos<sup>44, 45, 53, 68, 84</sup>, não se verificaram diferenças entre os grupos de doentes com determinação de Ac positiva ou negativa.

No que diz respeito ao método serológico comercial, utilizado no estudo, este engloba três Ag que são expressos por quase todas as estirpes de *P. aeruginosa* e que possuem elevada imunogenicidade<sup>69</sup>. O teste está devidamente validado e padronizado, e disponível para aquisição a nível internacional. Apesar de ser dispendioso, pode ser facilmente executado por profissionais com treino em testes serológicos e fornece resultados mais rápidos do que o isolamento em cultura. Deste modo, pode ser facilmente adotado por laboratórios clínicos nacionais, o que se torna vantajoso na prática clínica.

Apesar das vantagens previamente descritas, existem alguns resultados controversos relativos ao método serológico. Alguns autores referem que uma avaliação serológica negativa não pode excluir infeção futura<sup>121</sup>, e nalguns estudos prévios não foram detetados Ac anti-*P. aeruginosa* em doentes com infeção precoce<sup>18, 121, 123</sup>. Estes resultados, opostos a outros já referidos, podem, eventualmente, ser explicados pelas

diferenças entre ensaios, entre tipo de secreções respiratórias analisadas e entre níveis de *cut-off* para determinar a positividade do método <sup>23</sup>.

Atualmente, e apesar das suas vantagens, não está recomendado o diagnóstico da infecção por *P. aeruginosa*, unicamente, através do método serológico <sup>34, 121</sup>. A avaliação laboratorial anual, englobando a determinação de Ac anti-*P. aeruginosa*, como exame complementar à avaliação da infecção pelo método cultural, tem sido utilizada nos Estados Unidos da América onde faz parte do padrão de cuidados de saúde nos doentes com FQ <sup>26</sup>.

## 6 - CONCLUSÕES

---

O presente trabalho pretendeu caracterizar o estado serológico e a capacidade discriminativa e preditiva do método serológico no diagnóstico da infeção por *P. aeruginosa* em doentes com FQ, seguidos no grupo pediátrico do Centro Especializado de FQ do HSM durante um ano.

Tendo em consideração que a determinação de Ac anti-*P. aeruginosa* é uma metodologia que não tem sido utilizada em Portugal, e dada a sua elevada sensibilidade e especificidade na deteção da infeção precoce por *P. aeruginosa*, pretendeu-se neste estudo fazer uma avaliação do método serológico em doentes com FQ.

Este trabalho é o primeiro realizado em Portugal, de que temos conhecimento até ao momento, que avalia a infeção por *P. aeruginosa* através do método serológico em doentes com FQ. No grupo estudado, o método serologia revelou elevada especificidade e valor preditivo do positivo para diagnóstico da infeção global por *P. aeruginosa*, com baixa sensibilidade e valor preditivo do negativo. Na deteção da infeção crónica, este método revelou elevados valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo do positivo e do negativo. Tal como demonstrado noutros centros de FQ, pode revelar-se útil se usado regularmente durante o seguimento clínico da nossa população de doentes, em conjunto com o método de referência para deteção da infeção por *P. aeruginosa*.

Por fim, os nossos resultados sugerem que a determinação de Ac é uma metodologia adequada para diagnosticar infeção crónica por *P. aeruginosa*, e que poderá ser

considerada como adjuvante ao exame cultural na avaliação da infecção global por *P. aeruginosa*, num grupo de crianças e adolescentes com FQ.

## 7 - LIMITAÇÕES DO ESTUDO E PERSPETIVAS FUTURAS

---

No presente estudo identificaram-se como limitações a pequena dimensão da amostra, a inexistência de um grupo de controlo e o facto se tratar de um estudo retrospectivo e transversal. Além do mais, os resultados não poderão ser alvo de comparação com os de outros ensaios serológicos que utilizem outros tipos de Ac (ex imunoglobulina M ou imunoglobulina A) ou Ac contra Ag diferentes.

Identificaram-se, ainda, como limitações, o facto de não se ter realizado o seguimento clínico e microbiológico dos doentes, após a realização do teste serológico, bem como a não realização de doseamentos de Ac, em mais momentos, ao longo do tempo de seguimento.

No sentido de realizar uma avaliação da evolução microbiológica dos doentes com FQ utilizando o método serologia, seria importante repetir a determinação de Ac anti-*P. aeruginosa* ao longo do tempo no nosso grupo de estudo. Deste modo seria possível correlacionar os resultados da serologia com os exames culturais e com a evolução clínica, para verificar se a seroconversão é indicadora de evolução para infeção crónica por *P. aeruginosa*. Também seria relevante monitorizar a resposta ao tratamento com antibióticos através da evolução do título de Ac anti-*P. aeruginosa* ao longo do tempo, em conjunto com o exame cultural, o que permitiria avaliar a eficácia da terapêutica de erradicação ou de manutenção (no caso de doentes com infeção intermitente ou crónica).

Em Portugal, seria pertinente realizar um estudo multicêntrico em doentes com FQ, para melhor avaliar a capacidade discriminativa e a capacidade preditiva do método serológico. Este estudo, idealmente, seria composto por uma amostra de dimensão superior e implicaria um adequado seguimento para verificar a correlação da seroconversão com a evolução clínica e microbiológica, e para avaliar a resposta à terapêutica específica anti-*P. aeruginosa*.

## 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. Amaral MD. Processing of CFTR: Traversing the cellular maze – how much CFTR needs to go through to avoid cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2005 Jun;39:479-91.
2. Amaral MD, Kunzelmann K. Molecular targeting of CFTR as a therapeutic approach to cystic fibrosis. *Trends Pharmacol Sci* 2007 Jul;28(7):334-41.
3. Andersen DH. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathological study. *Am J Dis Child* 1938 Ag;56(2):344-99.
4. Anderson DM, Frank DW. Five mechanisms of manipulation by bacterial effectors: a ubiquitous theme. *PLoS Pathog* 2012;8(8):e1002823. doi:10.1371/journal.ppat.1002823.
5. Anstead M, Heltshe SL, Khan U, Barbieri JT, Langkamp M, Döring G et al. *Pseudomonas aeruginosa* serology and risk for reisolation in the EPIC trial. *J Cyst Fibros* 2013 Mar;12(2):147-53.
6. Armstrong DS, Grimwood 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 Maio;21(5):267-75.
7. Awatade N, Uliyakina I, Farinha CM, Clarke LA, Mendes K, Solé A et al. Measurements of Functional Responses in Human Primary Lung Cells as a Basis for Personalized Therapy for Cystic Fibrosis. *EBioMedicine* 2014 Dez;2(2):147-53.
8. Ballok AE, O'Toole GA. Pouring Salt on a Wound: *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Factors Alter Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> Flux in the Lung. *J Bacteriol* 2013 Set;195(18):4013-9.
9. Barbieri JT, Sun J. *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2004 Nov;152:79-92.

10. Baron EJ, Miller JM, Weinstein MP, Richter SS, Giligan PH, Thomson RB et al. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). *Clin Infect Dis* 2013 Ag;57(4):e22-121. doi: 10.1093/cid/cit278.
11. Barreto C. Fibrose Quística. In: Marques Gomes MJ, Sotto-Mayor R, editores. *Tratado de Pneumologia*. Lisboa. Pernmanyer Portugal; 2003. pp.927-43.
12. Beringer PM, Appleman MD. Unusual respiratory bacterial flora in cystic fibrosis: microbiologic and clinical features. *Curr Opin Pulm Med* 2000 Nov;6(6):545-50.
13. Berlie I, Leboucher B, Leblanc M, Troussier F, Pellier I, Chevalier A et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in cystic fibrosis. Frequency and significance. *Arch Pediatr* 2005 Fev;12(2):140-3.
14. Bleves S, Viarre V, Salacha R, Michel GP, Filloux A, Voulhoux R. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. *Int J Med Microbiol* 2010 Dez;300(8):534-43.
15. Blouquit S, Regnier A, Dannhoffer L, Fermanian C, Naline E, Boucher R et al. Ion and fluid transport properties of small airways in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006 Ag;174(3):299-305.
16. Bodey GP, Boliva R, Fainstein V, Jadeja L. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis* 1983 Mar;5(2):279-313.
17. 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 Ag; 26(8):1565-70.
18. 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 Fev;183(3):444-52.

19. Castellani C, Cuppens H, Macek M, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros* 2008 Maio;7:179–96.
20. Chambers LA, Rollins BM, Tarran R. Liquid movement across the surface epithelium of large airways. *Respir Physiol Neurobio* 2007 Dez;159(3):256–70.
21. Chmiel JF, Davis PB. State of the art: Why do the lungs of patients with cystic fibrosis become infected and why can't they clear the infection? *Respir Res* 2003 Ag;4:8. doi:10.1186/1465-9921-4-8.
22. Cleveland RH, Zurakowski D, Slattery D, Colin AA. Cystic Fibrosis Genotype and Assessing Rates of Decline in Pulmonary Status. *Radiology* 2009 Dez;253(3):813-21.
23. 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 Ag;43(8):3956-62.
24. Colombo C, Littlewood J. The implementation of standards of care in Europe: state of the art. *J Cyst Fibros* 2011 Jun;10(2):S7-15.
25. Cystic Fibrosis Mutation Database. [Online] 2011 [atualizado a 25.04.2011]. Disponível em: [www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage.html](http://www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage.html) [acedido a 22.06.2015].
26. Cystic Fibrosis Foundation. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry: Annual Data Report 2012. [Online] 2013. Disponível em: <http://www.cff.org/UploadedFiles/research/ClinicalResearch/PatientRegistryReport/012-CFF-Patient-Registry.pdf> [acedido a 1.7.2015].
27. Daines C, VanDeVanter D, Khan U, Emerson J, Heltshe S, McNamara S et al. Serology as a diagnostic tool for predicting initial *Pseudomonas aeruginosa* acquisition in children with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2014 Set;13:542–9.
28. 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 Jun;10(2):S53–66.

29. Deng Q, Barbieri JT. Molecular mechanisms of the cytotoxicity of ADP-ribosylating toxins. *Annu Rev Microbiol* 2008 Out;62:271–88.
30. Deretic V, Gill JF, Chakrabarty AM. Gene algD coding for GDP - Minireview mannose dehydrogenase is transcriptionally activated in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1987 Jan;169:351–8.
31. Deschaght P, Van Daele S, De Baets F, Vaneechoutte M. PCR and the detection of *Pseudomonas aeruginosa* in respiratory samples of CF patients. A literature review. *J Cyst Fibros* 2011 Set;10(5):293-7.
32. Dodge JA, Lewis PA, Stanton M, Wilsher J. Cystic fibrosis mortality and survival in the UK: 1947-2003. *Eur Respir J* 2007 Mar;29(3):522-6.
33. 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 Out;16(4):749-67.
34. Döring G, Høiby N, Consensus Study Group. Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: a European consensus. *J Cyst Fibros* 2004 Jun;3(2):67-91.
35. Döring G, Høiby N. Longitudinal study of immune response to *Pseudomonas aeruginosa* antigens in cystic fibrosis. *Infect Immun* 1983 Out;42(1):197-201.
36. Döring G, Parameswaran IG, Murphy TF. Differential adaptation of microbial pathogens to airways of patients with cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease. *FEMS Microbiol Rev* 2011 Jan;35(1):124-46.
37. Döring G, Ratjen F. Immunology of cystic fibrosis. In: Hodson ME, Geddes D, Bush A, editores. *Cystic Fibrosis*. 3ª ed. Londres. Arnold Hammer; 2007. pp.69-80.
38. Douglas TA, Brennan S, Berry L, Winfield K, Wainwright CE, Grimwood K, et al. Value of serology in predicting *Pseudomonas aeruginosa* infection in young children with cystic fibrosis. *Thorax* 2010 Nov;65(11):985-90.

39. Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs* 2007;67(3):351-68.
40. Eber E, Zach MS. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: prevent, eradicate or both?. *Thorax* 2010 Out;65(10):849-51.
41. Engel J, Balachandran P. Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr Opin Microbiol* 2009 Fev;12(1):61–6.
42. Engel J, Eran Y. Subversion of mucosal barrier polarity by *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol* 2011 Maio;2:114. doi:10.3389/fmicb.2011.00114.
43. Evans AS. Epidemiological concepts. In: Evans As, Brachman PS, editores. *Bacterial infections of humans: Epidemiology and control*. 3ª ed. Nova Iorque. Plenum Medical Book Company; 1998. pp.3-64.
44. Farrell PM, Lai HJ, Li Z, Kosorok MR, Laxova A, Green CG et al. Evidence on improved outcomes with early diagnosis of cystic fibrosis through neonatal screening: enough is enough! *J Pediatr* 2005 Set;147(3):S30-6.
45. 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 Ag;153(2):S4–14.
46. Farrell MH, Farrell PM. Newborn screening for cystic fibrosis: ensuring more good than harm. *J Pediatr* 2003 Dez;143(6):707-12.
47. Farrell PM, Govan JR. *Pseudomonas* serology: confusion, controversy and challenge. *Thorax* 2006 Ag;61(8):645-7.
48. Frederiksen B, Koch C, Høiby N. Antibiotic treatment of initial colonization with *Pseudomonas aeruginosa* postpones chronic infection and prevents deterioration of pulmonary function in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1997 Maio;27(5):330-5.
49. Frederiksen B, Lanng S, Koch C, Høiby N. Improved survival in the Danish center-treated cystic fibrosis patients: results of aggressive treatment. *Pediatr Pulmonol* 1996 Mar;21(3):153-8.

50. Garcia AD, Ibarra A Rodriguez FC, Casal M. Sensibilidad a antimicrobianos de los aislamientos bacterianos de pacientes con fibrosis quística. *Rev Esp Quimioter* 2004 Dez;7(4):332-5.
51. Gellatly SL, Hancock RE, Pseudomonas aeruginosa: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis* 2013 Abr;67(3):159-73. doi: 10.1111/2049-632X.12033.
52. Genetics Home Reference. U.S. National Library of Medicine. [Online] 2008. Disponível em: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/CFTR> [acedido a 19.06.2015].
53. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003 Out; 168(8):918–51.
54. Gilligan PH, Kiska DL, Appleman MD. Pseudomonas aeruginosa. In: Appleman MD, editor. *Cumitech 43 - Cystic fibrosis microbiology*. Washington. ASM Press; 2006. pp.4-5.
55. Gilligan PH. Microbiology of cystic fibrosis lung disease. In: Yankaskas JR e Knowles ML, editores. *Cystic Fibrosis in Adults*. Filadélfia. Lippincott Raven Publishers; 1999. pp.93-114.
56. Groman JD, Meyer ME, Wilmott RW, Zeitlin PL, Cutting GR. Variant cystic fibrosis phenotypes in the absence of CFTR mutations. *N Engl J Med* 2002 Ag;8;347(6):401-7.
57. Gutierrez JP, Grimwood K, Armstrong DS, Carlin JB, Carzino R, Olinsky A et al. Interlobar differences in bronchoalveolar lavage fluid from children with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2001 Fev;17(2):281-6.
58. 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.

59. Herbst F, Søndergaard MT, Kjeldal H, Stensballe A, Nielsen PH, Dueholm MS. Major Proteomic Changes Associated with Amyloid-Induced Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Proteome Res* 2015 Jan;14(1):72-81.
60. Hogardt M, Heesemann J. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during persistence in the cystic fibrosis lung. *Int J Med Microbiol* 2010 Dez;300(8):557-62.
61. Hogardt M, Heesemann J. Microevolution of *Pseudomonas aeruginosa* to a chronic pathogen of the cystic fibrosis lung. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013;358:91–118. doi: 10.1007/82\_2011\_199.
62. Høiby 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.
63. Høiby N, Döring G, Schiøtz PO. The role of immunocomplexes in the pathogenesis of bacterial infections. *Ann Rev Microbiol* 1986;40:140-3.
64. Holsing E, Granstrom M, Vasil ML et al. Prospective study of serum antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* exoproteins in cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1988;26:1830-6.
65. Hugh R, Leifson E. The proposed neotype strains of *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter 1982) Migula 1900. *International J Syst Evol Microbiol* 1964 Abr;14(2):69-84.
66. Hunter RC, Klepac-Ceraj V, Lorenzi MM, Grotzinger H, Martin TR, Newman DK. Phenazine content in the cystic fibrosis respiratory tract negatively correlates with lung function and microbial complexity. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012 Dez;47(6):738-45.
67. Johansen HK, Nørregaard L, Gøtzsche 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 CF patients after

- onset of chronic *P.aeruginosa* lung infection. *Pediatr Pulmonol* 2004 Maio;37(5):427-32.
68. Jones AM, Webb AK. Recent advances in cross-infection in cystic fibrosis: Burkholderia cepacia complex, Pseudomonas aeruginosa, MRSA and Pandoraea spp. *J R Soc Med* 2003;96(43):66-72.
69. Kapler 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 Ag;61(8):684–8.
70. Kapler M, Nagel F, Feilcke M, Heilig G, Grimmelt AC, Pawlita I et al. Predictive values of antibodies against Pseudomonas aeruginosa in patients with cystic fibrosis one year after early eradication treatment. *J Cyst Fibros* 2014 Set;13(5):534–41.
71. Kessler E, Ohman DE. Pseudolysin. In: Barrett AJ, Rawling ND, Woessner F, Jr, editores. Handbook of Proteolytic Enzymes. Londres. Academic Press; 1998. pp.357.
72. Kessler E, Safrin M, Gustin JK, Ohman DE. Elastase and the LasA protease of Pseudomonas aeruginosa are secreted with their propeptides. *J Biol Chem* 1998 Nov;273(46):30225-31.
73. Kida Y, Higashimoto Y, Inoue H, Shimizu T, Kuwano K. A novel secreted protease from Pseudomonas aeruginosa activated NF-kappaB through protease-activated receptors. *Cell Microbiol* 2008 Jul;10(7):1491-504.
74. Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. Targeting mechanisms of Pseudomonas aeruginosa pathogenesis. *Med Mal Infect* 2006 Fev;36(2):78-91.
75. Koch C, McKensey SG, Kaplowitz H, Hodson ME, Horms HK, Navarro J et al. International practice patterns by age and severity of lung disease in cystic fibrosis: data of the Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis (ERCF). *Pediatr Pulmonol* 1997 Ag;24(2):147-54.

76. 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 Out;32(4):277-87.
77. Lau GW, Hassett DJ, Britigan BE. Modulation of lung epithelial functions by *Pseudomonas aeruginosa*. *Trends Microbiol* 2005 Ag;13(8):389–97.
78. Le Gall F, Le Berre R, Rosec S, Hardy J, Gouriou S, Boisramé-Gastrin S. Proposal of a quantitative PCR-based protocol for an optimal *Pseudomonas aeruginosa* detection in patient with cystic fibrosis. *BMC Microbiol* 2013 Jun;13:143. doi: 10.1186/1471-2180-13-143.
79. Lee TW, Brownlee KG, Conway SP, Denton M, Littlewood JM. Evaluation of a new definition for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros* 2003 Mar;2(1):29–34.
80. Lee TW, Brownlee KG, Denton M, Littlewood JM, Conway SP. Reduction in prevalence of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection at a regional pediatric cystic fibrosis center. *Pediatr Pulmonol* 2004 Fev;37(2):104-10.
81. Li Z, Kosorok MR, Farrel 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 Fev;293(5):581-8.
82. Liu PV. Exotoxins of *Pseudomonas aeruginosa*. I. Factors that influence the production of exotoxin A. *I J Infect Dis* 1973;128:506-13.
83. Logan C, Habington A, Lennon G, Cronin F, O'Sullivan N. Evaluation of the efficacy of real-time polymerase chain reaction for the routine early detection of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis sputum and throat swab specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010 Dez;68:358-65.
84. McCloskey M, McCaughan J, Redmond AOB, Elborn JS. Clinical outcome after acquisition of *Burkholderia cepacia* in patients with cystic fibrosis. *Ir J Med Sci* 2001;170(1):28-31.

85. Miall LS, McGinley NT, Brownlee KG, Conway SP. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 2001 Fev;84(2):160-2.
86. 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 Abr;44(4):392-401.
87. Morihara K. Pseudolysin and other pathogen endopeptidases of thermolysin family. *Methods Enzymol* 1995;248:242–53.
88. Morihara K, Homma JY. *Pseudomonas* proteases. In: Holder IA, editor. *Bacterial Enzymes and Virulence*. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1985. pp.41-79.
89. Moser C, Kjaergaard S, Pressler T, Kharazmi A, Koch C, Hoiby N. The immune response to chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis is predominantly of the Th2 type. *APMIS* 2000 Maio;108(5):329-35.
90. Nixon PA, Orenstein DM, Kelsey SF, Doershuk CF. The prognostic value of exercise testing in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1992 Dez;327(25):1785-8.
91. Ochoa CD, Alexeyev M, Pastukh V, Balczon R, Stevens T. *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin Y is a promiscuous cyclase that increases endothelial tau phosphorylation and permeability. *J Biol Chem* 2012 Jul;287(30):25407–18.
92. Ohman DE, Chakrabarty AM. Genetic mapping of chromosomal determinants for the production of the exopolysaccharide alginate in a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate. *Infect Immun* 1981 Jul;33(1):142–8.
93. Oliver A, Mena A. Bacterial hypermutation in cystic fibrosis, not only for antibiotic resistance. *Clin Microbiol Infect* 2010 Jul;16(7):798–808.
94. Osterholm MT, Hedberg CW, Moore KA. Epidemiologic principles. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editores. *Principles and practice of infectious diseases*. 5ª ed. Filadélfia: Churchill Livingstone; 2000. pp.156–67.

95. Orozco L, Chávez M, Saldana Y, Velázquez R, Carnevale A, González-del Angel A et al. Cystic fibrosis: molecular update and clinical implications. *Rev Invest Clin* 2006 Mar;58(2):139-52.
96. Pacheco P. Detection rate of CF causing CFTR mutations in Portugal. In: WHO, editor. *The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis: Report of a joint meeting of WHO/ECFTN/ICF(M)A/ECFS*. Human Genetics Programme, Chronic Diseases and Health Promotion, World Health Organization. 2004.
97. Pinto M, Pereira L, Rodrigues T, Barreto C. Cystic Fibrosis Survival in Portugal: a survival study. *J Cyst Fibros* 2010;9(1):S113.
98. Pitt TL, Kaufmann ME, Patel PS, Benge LC, Gaskin S, Livermore DM. Type characterisation and antibiotic susceptibility of Burkholderia (Pseudomonas) cepacia isolates from patients with cystic fibrosis in the United Kingdom and the Republic of Ireland. *J Med Microbiol*. 1996; 44(3):203-10.
99. Pressler T, Bohmova C, Conway S, Dumcius S, Hjelte L, Høiby N et al. Chronic Pseudomonas aeruginosa infection definition: EuroCareCF Working Group report. *J Cys Fibros* 2011 Jun;10(2):S75–8.
100. Pressler T, Karpati F, Granström M, Knudsen PK, Lindblad A, Hjelte L et al. Diagnostic significance of measurements of specific IgG antibodies to Pseudomonas aeruginosa by three different serological methods. *J Cyst Fibros* 2009 Jan;8(1):37-42.
101. Pritt B, O'Brien L, Winn W. Mucoid Pseudomonas in Cystic Fibrosis. *Am J Clin Pathol* 2007 Jul;128:32-34.
102. Rada B, Leto TL. Pyocyanin effects on respiratory epithelium: relevance in Pseudomonas aeruginosa airway infections. *Trends Microbiol* 2013 Fev;21(2):73-81.
103. Ratjen F. Cystic fibrosis: pathogenesis and future treatment strategies. *Respir Care* 2009 Maio;54(5):595-605.
104. Ratjen F, Döring G. Cystic Fibrosis. *Lancet* 2003;361:681-9.

105. 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.
106. Read RC, Roberts P, Munro N, Rutman A, Hastie A, Shryock T et al. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on mucociliary transport and ciliary beating. *J Appl Physiol* 1992 Jun;72(6):2271–7.
107. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989 Set;245(4922):1059-65.
108. Rosenfeld M, Emerson J, Accurso F, Armstrong D, Castile R, Grimwood K et al. Diagnostic accuracy of oropharyngeal cultures in infants and young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1999 Nov;28(5):321-8.
109. Rosenstein BJ, Cutting GR. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr* 1998 Abr;28(7);132:589-95.
110. Saiman L, Siegel 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 Maio;31(3):S1-62.
111. Santis, G. Basic molecular genetics. In: Hodson ME, Geddes DM, editores. *Cystic Fibrosis*. Londres: Chapman and Hall; 1995. pp.15-39.
112. Sheppard, MN. The pathology of cystic fibrosis. In: Hodson ME, Geddes DM, editores. *Cystic Fibrosis*. Londres: Chapman and Hall; 1995. pp.131-49.
113. Skerman VB, McGowan V, Sneath PH, editores. Approved Lists of Bacterial Names, amended edition. American Society for Microbiology. ASM Press; 1989.
114. Sousa R, Pereira L, Cavaco J, Silva T, Vaz LG, Rocha H, et al. First year evaluation of the Portuguese pilot neonatal screening for Cystic Fibrosis. *J Cys Fibros* 2015 Jun;14(1):S42.

115. Southern KW. Atypical Cystic Fibrosis. *Eur Resp Mono* 2006;35:38-49.
116. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner O, Hickey MJ, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 2000 Ag;406(6799):959-64.
117. Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, Hamrick M, Cohn JA, Rossier BC et al. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* 1995 Ag;269:847–50.
118. Thomas SR, Gyi KM, Gaya H, Hodson ME. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: impact at a national cystic fibrosis centre. *J Hosp Infect* 1998 Nov;40(3):203-9.
119. Thomassen MJ, Klinger JD, Badger SJ, van Heeckeren DW, Stern RC. Cultures of thoracotomy specimens confirm usefulness of sputum cultures in cystic fibrosis. *J Pediatr* 1984 Mar;104(3):352-6.
120. Tingpej P, Smith L, Rose B, Zhu H, Conibear T, Nassafi K, et al. Phenotypic characterization of clonal and nonclonal *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from lungs of adults with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2007 Jun;45(6):1697–704.
121. Tramper-Stranders GA, van der Ent CK, Slieker MG, Terheggen-Lagro SW, Teding van Berkhout F, Kimen JL et al. Diagnostic value of serological tests against *Pseudomonas aeruginosa* in a large cystic fibrosis population. *Thorax* 2006 Ag; 61(8):689-93.
122. Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 1993 Jul;73(7): 1251-4.
123. 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 Jun;287(22):2958–67.
124. Williams BJ, Dehnbostel J, Blackwell TS. *Pseudomonas aeruginosa*: host defence in lung diseases. *Respirology* 2010 Out;15(7):1037-56.

125. 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(2):92-100.
126. Wolf P, Elsasser-Beile U. *Pseudomonas* exotoxin A: from virulence factor to anticancer agent. *Int J Med Microbiol* 2009 Mar;299(3):161-76.
127. World Health Organization. Genes and Human disease. [Online] 2015 Disponível em: <http://www.who.int/genomics/public/geneticdiseases/en/index2.html#CF> [acedido a 23.07.2015].
128. Zielenski J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration* 2000;67(2):117-23.