

RESUMO DE TESE

ESTUDO MICROBIOLÓGICO EM PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA E FENOTIPAGEM DE AMOSTRAS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* NÃO MUCOÍDES E MUCOÍDES

O estudo da flora microbiana respiratória de 90 pacientes com fibrose cística mostrou-nos ser a *P. aeruginosa* o germe mais freqüente, tendo sido isolado o morfotipo NM em 47,7% e mucóide em 30% dos pacientes, seguido de *S. aureus* (66,7%). Enterobactérias, *Haemophilus sp.* e *Candida sp.* foram encontradas em cerca de 30% dos pacientes. Outros microrganismos foram isolados em menos de 10% dos pacientes.

O grupo controle, constituído por pacientes com outras patologias respiratórias, mostrou os mesmos germes, porém, em percentuais significativamente inferiores, além de não ter sido encontrado em nenhum deles a *P. aeruginosa* mucóide.

A prevalência e a incidência dos patógenos respiratórios em 5 anos de observação nos mesmos pacientes mostrou índices relativamente estáveis para alguns dos germes, porém, para outras houve uma tendência a um aumento, especialmente para *P. aeruginosa* mucóide.

A evolução da colonização pulmonar dos principais germes associados às infecções respiratórias, em 22 pacientes estudados por até 8 anos, revelou que a associação mais freqüente e também a mais persistente se dá entre *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Em alguns dos pacientes estão presentes os dois morfotipos, já em outros apenas as formas NM ou M junto com o *S. aureus*. A este perfil de colonização somou-se o *H. influenzae* que em muitos pacientes mostrou-se persistente.

Somente em dois pacientes estudados, encontramos unicamente as duas variantes de *P. aeruginosa* sem associação com nenhum germe.

Na maioria dos pacientes, o *S. aureus* foi o colonizador inicial precedendo *P. aeruginosa*, que também na maior parte dos casos mostrou-se primeiro como não mucóide. Porém, em 3 pacientes encontramos a forma mucóide precedendo o

MICROBIOLOGICAL STUDY IN PATIENTS WITH CYSTIC FIBROSIS AND PHENOTYPING OF SAMPLES OF BOTH NON-MUCOID AND MUCOID *PSEUDOMONAS* *AERUGINOSA*

Ninety patients with cystic fibrosis were studied looking for their bacterial constituent flora. *Pseudomonas aeruginosa* was most frequently found. The non-mucoid morphotype was found in 47.7% and the mucoid one in 30% of the patients. *Staphylococcus aureus* (66.7%) was the second most frequent species. *Enterobacteriaceae*, *Haemophilus sp.* and *Candida sp.* were also found in about 30% of the patients. Other bacterial microorganisms were present in less than 10% of the cases.

The same microorganisms were found in a control group, that was constituted of patients with other respiratory disorders but the frequency was significantly lower. Mucoid *P. aeruginosa* was not found among strains of the control group.

The prevalence and frequency of respiratory pathogens observed during five years in the analysed patients were relatively stable for some microorganisms. However, for others, there was a tendency to increase, mainly for mucoid *P. aeruginosa*.

The pattern of pulmonary colonization was followed in 22 patients during eight years. *P. aeruginosa* and *S. aureus* were the most frequent and persistent association. Some patients were infected with the morphotypes of *P. aeruginosa* simultaneously, but in other patients only one morphotype co-existed with *S. aureus*. In several patients, we found persistently *H. influenzae* in association with *P. aeruginosa* and *S. aureus*.

Mucoid and non-mucoid *P. aeruginosa* were isolated in pure culture in only two patients.

The initial colonizer in the majority of the patients, was *S. aureus* preceding the non-mucoid *P. aeruginosa*. In 3 patients, however, mucoid strains preceded the non-mucoid morphotype. In

morfotipo NM. Em alguns pacientes houve o desaparecimento de *S. aureus*.

A frequência de isolamento dos patógenos respiratórios em diferentes materiais do trato respiratório mostrou que o escarro é o espécime de escolha para *P. aeruginosa*. Na ausência de escarro, a secreção do orofaringe pode ser usada como substituto no isolamento deste germe, porém para *S. aureus* e *S. pneumoniae* a secreção do nasofaringe é o material de escolha. Entretanto, todos os espécimes clínicos mostraram percentuais de falso-negativos, o que indica o uso associado desses materiais para aumentar as chances de maior positividade.

A análise das culturas de escarro pelos métodos qualitativo e quantitativo mostrou que as taxas de isolamento foram semelhantes, para a maioria dos germes, nas duas metodologias. Entretanto, ambas deixaram de identificar importantes patógenos. A técnica convencional mostrou-se mais inadequada para *P. aeruginosa* NM e *Haemophilus sp*, enquanto a quantitativa deixou de detectar um maior número de casos positivos de *S. aureus*.

A correlação entre as duas metodologias foi maior nos casos negativos e, naqueles positivos, o aumento da copositividade relacionou-se com o aumento da densidade microbiana, especialmente em contagens superiores a 10^5 UFC/ml para *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *Haemophilus sp*. Assim é possível que o seu uso associado melhore os índices de isolamento desses patógenos.

Determinamos a contagem de leucócitos PMN/ mm^3 e a densidade dos diferentes microrganismos no escarro dos pacientes, com o propósito de verificarmos se o número daquelas células no escarro poderia ser usado como indicador dos quadros de exacerbações ou remissões pulmonares. Não encontramos correlação entre esses dois parâmetros.

A tipagem realizada em 1183 amostras de *P. aeruginosa*, pela determinação de padrão fisiológico frente a 15 provas bioquímicas, mostrou que existe grande diversidade de biotipos tanto entre as NM como entre as M, porém dois biotipos foram mais frequentes: 47813 e 47513. Estes corresponderam a resultados não usuais para essa espécie, para algumas provas bioquímicas.

Além disso, encontramos que a população infectante de *P. aeruginosa* pode ser fenotipicamente heterogênea em alguns pacientes, não havendo,

some patients initially colonized with *S. aureus*, these strains were no more found in subsequent cultures.

The frequency of isolation of the respiratory pathogens in different specimens showed that sputum was the specimen of choice for *P. aeruginosa*. If the sputum was not available samples from oropharynx were the second specimen of choice. Specimens from nasopharynx were best when looking for *S. aureus* and *S. pneumoniae*.

In all types of specimens false negative results were obtained. This indicates that the concomitant use of three specimens is most useful to enhance the sensitivity of the bacteriological examination.

Results were similar both in the qualitative and quantitative sputum cultures considering the predominant of respiratory pathogens.

Qualitative sputum cultures were inadequate for the isolation of non mucoid *P. aeruginosa* and *Haemophilus sp*, whereas quantitative cultures were negative in several specimens with *S. aureus*.

The correlation between both techniques was high for negative cultures and positive results were related with higher microbial density, specially in sputa with colonies counts above 10^5 UFC/ml for *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *Haemophilus sp*. The associated use of both methodologies possibly would enhance the frequency of positive cultures.

To evaluate if the number of PMN leucocytes in sputum would be an useful indicator of exacerbations and remissions, of the pulmonary infection, the number of such cells was determined besides the microbial density in sputa collected from fibrocystic patients. No correlation was found.

The phenotyping of 1183 strains of *P. aeruginosa* was determined by the use of 15 biochemical tests. We observed there was a great diversity of biotypes among the non-mucoid and as well as in the mucoid morphotypes. Two biotypes designated 47813 and 47513 were most frequent and their physiological patterns did not correspond to the commonly observed within these species.

Multiple phenotypes in the *P. aeruginosa* population in the same patients were found. The heterogenous of the *P. aeruginosa* population was

porém, correlação entre o encontro de populações mistas e o grau de variabilidade fenotípica com a gravidade do quadro clínico do paciente. Entretanto, verificamos que o biotipo 47813 associou-se à melhor condição clínica enquanto o tipo 47513 foi mais comum nos pacientes com o pior quadro.

Com o acompanhamento prospectivo dos pacientes através da biotipagem, foi possível mostrar que a população é flutuante, podendo ser mista e/ou homogênea. Com a evolução da doença existe uma tendência à substituição de alguns biotipos que não ressurgiram posteriormente, revelando um quadro bastante dinâmico e de adaptabilidade desses microrganismos. A análise fenotípica semelhante com cepas de *P. aeruginosa* mucóides de infecções do trato urinário não mostrou o mesmo comportamento.

Todos os outros métodos de tipagem usados por nós (piocinotipagem, antibiotipagem e sensibilidade à ação bactericida do soro humano normal) também mostraram que alguns pacientes albergam populações de *P. aeruginosa* fenotipicamente heterogêneas. À semelhança do que encontramos na biotipagem, o teste de sensibilidade a antibióticos mostrou maior frequência de três antibiotipos.

As populações fenotipicamente mistas, e também a estreita relação entre os dois biotipos mais frequentes com a condição clínica do paciente poderão refletir diferenças entre as cepas em relação a vários aspectos como adesão, fatores de virulência e outros que possam contribuir para manutenção desses microrganismos no ambiente pulmonar.

not associated with the clinical conditions of the patients. Nevertheless, biotype 47813 was associated with the more favorable clinical condition whereas the biotype 47513 was more frequent among patients with the poorest clinical conditions.

The prospective follow-up of patients by the use of biotyping had shown that the bacterial population is fluctuant and may or may not be homogeneous. With progression of the disease a tendency develops for substitution of some biotypes. Those did not reappear lately, revealing a very dynamic situation in the adaptability of these microrganisms. The same phenotypical analyses done with mucoid strains of *P. aeruginosa* isolated from the urinary tract did not reveal a similar behaviour.

Other methods which were used (piocinotyping, antibiotyping and sensibility to bactericidal action of normal serum) pointed out that some patients lodge populations of phenotypically heterogeneous *P. aeruginosa*. As with biotyping, antibiotic sensibility showed the presence of three antibiotypes.

The phenotypically mixed populations and also the narrow relationship between two more frequent biotypes and the patient clinical conditions may reflect differences among strains considering several distinctive characteristics such as adhesion, virulence factors and other biological markers that contribute to the maintenance of the microrganisms in the respiratory tract.

Elizabeth de Andrade Marques

Tese apresentada ao Instituto de Microbiologia da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
para obtenção do Título de Doutor.
Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1993.