

SOROTIPOS E PIOCINOTIPOS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA**

Tânia Mara Ibelli VAZ**
Kinue IRINO**
Iika Maria LANDGRAF**
Maria Cristina de Cunto BRANDILEONE**
Vera Simonsen Dias VIEIRA**

RIALA6/678

VAZ, T.M.I.; IRINO, K.; LANDGRAF, I.M.; BRANDILEONE, M.C.C. & VIEIRA, V.S.D. — Sorotipos e piocinotipos de *Pseudomonas aeruginosa*. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 49(2):193-198, 1989.

RESUMO: 195 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, a maioria isoladas de sangue e de líquido cefalorraquidiano foram sorotipadas de acordo com o método de aglutinação em lâmina. Os sorotipos 0:6 e 0:11 foram os tipos prevalentes com 25,64% e 20,54%, respectivamente. O sorotipo 0:10 causou um surto de meningite envolvendo principalmente crianças com menos de um ano de idade, em 1974, na vigência da epidemia de meningite meningocócica na cidade de São Paulo. Dentre os sorotipos foram encontrados 12 diferentes piocinotipos com predominância dos tipos 1,3 e 10 que correspondem a cerca de 90% das cepas tipadas. É importante o uso combinado dos métodos de sorotipagem e piocinotipia para diferenciação de cepas pertencentes a um mesmo sorotipo.

DESCRIPTORIOS: *Pseudomonas aeruginosa*, sorotipos, piocinotipos.

INTRODUÇÃO

A *Pseudomonas aeruginosa* representa um dos mais importantes agentes de infecções nosocomiais causadas por bacilos Gram negativos^{6, 15, 22}.

Infecções em pacientes hospitalizados, por estes patógenos oportunistas, têm atingido especialmente imunodeprimidos, queimados e recém-nascidos prematuros. Estes microrganismos estão também frequentemente associados à fibrose cística^{2, 14, 20, 24}.

A multirresistência antibacteriana, freqüente entre as cepas de *P. aeruginosa*, tem representado um grande problema terapêutico, principalmente para os pacientes de risco onde as infecções têm geralmente graves conseqüências como a meningite, pneumonia e bacteriemia com taxas significantes de mortalidade^{4,7}.

Os alimentos, principalmente os vegetais, a

água de nebulizadores, flores e mesmo desinfetantes têm sido incriminados como os mais comuns reservatórios de *P. aeruginosa* no meio ambiente hospitalar^{16, 21, 29}.

Estudos epidemiológicos de infecções hospitalares por *P. aeruginosa* foram realizados em vários países, utilizando diferentes marcadores tais como sorotipos, piocinotipos, padrões de resistência aos antibacterianos e fagotipos.

Relatos sobre ocorrência de infecções sistêmicas por *P. aeruginosa* têm sido freqüentes em nosso meio; entretanto, somente a caracterização de cepas através de seus diferentes marcadores permite o estudo da epidemiologia desta infecção.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar as cepas de *P. aeruginosa* de origem hospitalar, isoladas no período de 1974 a 1987, através de métodos de sorotipagem e piocinotipia, e verificar

* Realizado na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

a possível correlação existente entre estes dois sistemas de marcadores epidemiológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepas Bacterianas

Foram estudadas 195 cepas de *P. aeruginosa*, sendo 88 isoladas de líquido cefalorraquidiano, 84 de sangue e 23 de outros materiais como de secreção pulmonar, ponta de cateter, secreção de orofaringe, abscesso, secreção do ouvido, urina e secreção ocular. A caracterização da espécie foi realizada baseando-se nas características bioquímicas apresentadas no "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"²³.

Método de identificação sorológica

Preparo de antissoro — Os antissoros foram preparados utilizando-se as cepas-padrão de *P. aeruginosa* recebidas do Departamento de Saúde do Estado de Nova York, Estados Unidos. Para o preparo dos antígenos, as cepas-padrões foram cultivadas em ágar tripton de soja por 18-20 horas, a 30°C em estufa. O crescimento bacteriano, ressuspenso em solução fisiológica, foi aquecido a 100°C, por 2 horas e 30 minutos e, a seguir, lavado 3 vezes com solução fisiológica estéril. Os antígenos, contendo aproximadamente 5×10^{10} bactérias por ml, foram inoculados por via endovenosa, em coelhos albinos com peso

superior a 2,5 kg. O esquema de imunização foi iniciado com 0,25 ml, seguido de 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 ml, com intervalo de 4 dias entre as inoculações¹⁷. A sangria dos coelhos foi feita 3 a 4 dias após a última inoculação. Os soros, após adição de mertiolate a 1/10.000, foram conservados a + 4°C. A titulação foi feita em lâmina e as reações cruzadas foram eliminadas através de absorção. Dos 17 soros somáticos específicos obtidos foram preparados quatro soros polivalentes com as seguintes constituições.

Soro polivalente A: 0:1 + 0:3 + 0:7 + 0:8
 Soro polivalente B: 0:2 + 0:5 + 0:9 + 0:16
 Soro polivalente C: 0:4 + 0:6 = 0:10 + 0:13 + 0:14
 Soro polivalente D: 0:11 + 0:12 + 0:15 + 0:17

Identificação sorológica — As cepas foram cultivadas em ágar comum por 18-24 horas a 30°C, em estufa. Suspensões bacterianas densas, em solução fisiológica, foram testadas em lâmina, inicialmente com os soros polivalentes e, a seguir, com os monovalentes.

Método de piocinotipia segundo FYFE et alii¹⁰

As cepas-padrões indicadoras foram recebidas do Departamento de Bacteriologia da Universidade de Edinburg, Escócia, Grã-Bretanha.

As cepas a serem testadas foram isoladas em

TABELA 1

Distribuição dos sorotipos de *P. Aeruginosa* segundo os materiais

Cepas			Material					
Sorotipo	Total		Sangue		LCR		Outros	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
01	17	8,72	10	11,91	5	5,68	2	8,69
02	14	7,18	4	4,76	8	9,09	2	6,69
03	5	2,56	3	3,57	1	1,14	1	4,35
04	7	3,59	2	2,38	6	6,82	0	0,00
05	15	7,70	6	7,14	7	7,95	2	8,69
06	50	25,64	31	36,91	12	13,63	-	30,44
07,8	5	2,56	2	2,38	3	3,41	0	0,00
09	2	1,03	1	1,19	1	1,14	0	0,00
010	19	9,74	2	2,38	17	19,32	0	0,00
011	40	20,51	13	15,48	19	21,59	7	30,44
016	13	6,67	9	10,71	3	3,41	1	4,35
NI	8	4,10	1	1,19	6	6,82	1	4,35
Total	195	100,0	84	100,00	88	100,00	23	100,00

LCR = Líquido cefalorraquidiano.

ágar Columbia (Oxoid) e incubadas por 18 horas, a 37°C. Para cada cepa, 1 colônia isolada em placa foi suspensa em 1 ml de solução fisiológica, de maneira a conter 10⁸—10⁹ bactérias/ml; oito placas de Petri contendo 10 ml de ágar tripton de soja foram inoculadas em forma de *spot* com 1 ml de cada suspensão. Após um período de incubação de 6 horas, a 30°C, o crescimento bacteriano foi inativado pela exposição ao clorofórmio por 15 minutos. A produção de piocinas foi verificada pela inibição das cepas indicadoras semeadas sobre os *spots*. Cada cepa indicadora foi cultivada em 2 ml de caldo comum, sem agitação, durante 4 horas e, a seguir, 0,1 ml de cada cultura foi misturada a 2,5 ml de ágar semi-sólido contendo 1% de peptona e 0,5% de ágar. Cada inóculo que continha uma das 8 cepas indicadoras foi vertido sobre a placa contendo os *spots* das cepas em estudo. A determinação dos piocinotipos foi baseada no perfil de inibição das 8 cepas indicadoras.

11 sorotipos, sendo 0:6 e 0:11 os mais freqüentemente encontrados com 25,64% e 20,54%, respectivamente (tabela 1).

Através do método de piocinotipia 89,76% das cepas puderam ser tipadas; foram encontrados em grandes proporções os piocinotipos 1, 3 e 10, perfazendo cerca de 90% das cepas tipadas; 5,13% foram produtoras de piocinas, porém não classificáveis e 5,13% não produziram piocinas (tabela 2).

As associações entre sorotipos e piocinotipos estão demonstradas na tabela 3. Verifica-se 100% de associação entre os sorotipos 0:11 e piocinotipo 10, sorotipo 0:5 e piocinotipo 1 e sorotipo 0:10 e piocinotipo 1; 92,9% dos sorotipos 0:16 são piocinotipo 1; 87,5% dos sorotipos 0:4 são piocinotipo 10; 80% dos sorotipos 0:7 são piocinotipo 1; 60% dos sorotipos 0:6 são piocinotipo 3 e 60% de 0:3 são piocinotipo 5.

RESULTADOS

A aplicação dos métodos de sorotipagem e piocinotipia foram considerados isoladamente, e também associados como partes de um sistema combinado de tipagem.

Das 195 cepas, 95,9% foram classificadas em

DISCUSSÃO

Entre os bacilos Gram-negativos envolvidos em infecções nosocomiais, *P. aeruginosa* tem se destacado como um dos responsáveis pela ocorrência destas infecções.

Nos estudos epidemiológicos, a utilização de marcadores tem contribuído na detecção de fontes

TABELA 2

Distribuição dos piocinotipos de *P. aeruginosa* segundo material

Piocinotipo	Cepas		Material					
	Total		Sangue		LCR		Outros	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
1	74	37,95	26	30,95	42	47,73	6	26,08
3	34	17,44	19	22,62	9	10,23	6	26,08
5	3	1,54	2	2,38	-	-	1	4,35
6	6	3,08	3	3,57	2	2,27	1	4,35
10	48	24,62	16	19,05	25	28,40	7	20,44
22	1	0,51	-	-	1	1,14	-	-
23	1	0,51	-	-	1	1,14	-	-
33	3	1,54	1	1,19	1	1,14	1	4,35
35	1	0,51	1	1,19	-	-	-	-
45	2	1,02	2	2,38	-	-	-	-
50	1	0,51	1	1,19	-	-	-	-
76	1	0,51	1	1,19	-	-	-	-
NC	10	5,13	5	5,95	4	4,55	1	4,35
NP	10	5,13	7	8,34	3	3,14	-	-
Total	195	100,00	84	100,00	88	100,00	23	100,00

NC = Não classificados.

NP = Não produtoras.

TABELA 3

Associação entre sorotipos e piocinotipos de *P. aeruginosa*

Cepas		Tipos de Associação				
Sorotipo	Nº	Sorotipos/piocinotipos	Nº	%		
01	17	01/NP	9	52,94		
		01/NT	5	29,41		
		01/P.22	1	5,88		
02	14	01/P.33	2	11,77		
		02/P.1	13	92,86		
		02/P.3	1	7,14		
03	5	03/P.5	3	60,00		
		03/P.35	1	20,00		
04	8	03/P.23	1	20,00		
		04/P.10	7	87,50		
05	15	04/P.1	1	12,50		
		05/P.1	15	100,00		
06	50	06/P.3	30	60,00		
		06/P.6	6	12,00		
		06/NT	5	10,00		
		06/P.1	4	8,00		
		06/P.45	2	4,00		
		06/P.76	1	2,00		
		06/P.33	1	2,00		
		06/P.50	1	2,00		
		07,8	5	07,8/P.1	4	80,00
				07,8/P.10	1	20,00
		09	2	09/P.1	2	100,00
010	19	010/P.1	19	100,00		
011	39	011/P.10	39	100,00		
016	13	016/P.1	12	92,31		
		016/P.3	1	7,69		
		NT/P.1	4	50,00		
NT*	8	NT/P.3	2	25,00		
		NT/P.10	1	12,50		
		NT/NP	1	12,50		
Total	195		195	100,00		

NC = Não tipável.

NP = Não produtora.

de contaminação e modos de disseminação da *P. aeruginosa* em ambientes hospitalares. Diferentes sistemas têm sido utilizados para tipar estes microrganismos e, entre eles, a sorotipagem e a piocinotipia têm sido amplamente utilizadas^{3,5,8,9,12,13,26}.

O método de identificação sorológica, baseado no estudo dos antígenos somáticos, diferencia atualmente as cepas de *P. aeruginosa* em 17 sorotipos¹⁹; os sorotipos 0:6 e 0:11 têm sido relatados como alguns dos mais frequentemente isolados de casos de infecções^{9, 18, 25}, fato este observado também entre as cepas incluídas neste estudo, isoladas na sua grande maioria de casos de septicemia e meningite.

Como microrganismo oportunista, qualquer sorotipo pode ser a causa de surtos de graves infecções como foi observado por nós com o sorotipo 0:10, responsável por vários casos de meningite, acometendo principalmente crianças menores de um ano, ocorrido em um hospital de São Paulo, em 1974, durante a epidemia de meningite meningocócica.

O método da piocinotipia, utilizado isoladamente ou de forma associada à sorotipagem, introduziu mais um importante marcador epidemiológico na caracterização de cepas de *P. aeruginosa*. Estudos com sistemas combinados revelaram que algumas associações existem entre determinados sorotipos com tipos piocinotípicos específicos^{1, 27, 28}.

As associações que foram encontradas entre sorotipos e piocinotipos foram significantes, uma vez que podemos verificar que cepas pertencentes a um mesmo sorotipo podem pertencer a piocinotipos diferentes. Assim, verificamos que a maioria das cepas, sorotipo 0:6, que foi o mais freqüente entre nós, está associada ao piocinotipo 3 e o restante das cepas está dividido entre outros piocinotipos, tratando-se portanto de cepas diferentes. Já a ocorrência de 100% de associação entre um sorotipo e um piocinotipo sugere tratar-se de uma mesma cepa, como ocorre com os sorotipos 0:11 e piocinotipo 10; sorotipo 0:5 e piocinotipo 1 e sorotipo 0:10 com piocinotipo 1. Portanto, a caracterização de cada um

dos 11 sorotipos em diferentes piocinotipos mostra a importância da utilização conjunta destes dois métodos de tipagem.

Agradecimentos

Agradecemos ao Dr. Mehdi Sayegani, Diretor do Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Saúde do Estado de Nova York, por fornecer as cepas padrões de *P. aeruginosa* para realização da sorotipagem, e ao Dr. J.R.W. Govan, do Departamento de Bacteriologia da Universidade de Edimburgh pela doação das cepas padrão de *P. aeruginosa* para a realização da piocinotipia.

RIALA6/678

VAZ, T.M.I.; IRINO, K.; LANDGRAF, I.M.; BRANDILEONE, M.C.C. & VIEIRA, V.S.D. — Serotypes and pyocinetypes of *P. pseudomonas aeruginosa* *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(2):193-198, 1989.

ABSTRACT; 195 *Pseudomonas aeruginosa* strains, most of them isolated from blood and cerebro spinal fluid cultures, were serotyped by slide agglutination test. The serotypes 0:6 and 0:11 were the prevalent types with 25,64% and 20,54% respectively. The serotype 0:10 caused a meningitis outbreak involving mainly children less than one year of age, in 1974 during meningococcal epidemic in São Paulo City. By Fyfe piocina typing method, 12 piocine types were disclosed among the serotypes with the predominance of pyocine types 1,3 and 10 that accounted for almost 90% of all typed strains. It's stressed the combined use of the serological and pyocine typing method in order to differentiate isolates belonging to the same serotype.

DESCRIPTOR: *Pseudomonas aeruginosa*, serotypes, pyocine types.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BERGAN, T. — Epidemiological markers for *Pseudomonas aeruginosa*. 1- Serogrouping, pyocine typing and their interrelations. *Actapathol. microbiol. scand.* 81 (b): 70-80, 1973.
2. BODEY, G.P.; BOLIVAR, R.; FAINSTEIN, V. & JADEJA, L. — Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* *Rev. infect. Dis.* 5(2): 279-313, 1983.
3. BROKOPP, C.D.; GOMEZ-LUS, R. & FARMER III, J.J. — Serological typing of *Pseudomonas aeruginosa*; use of commercial antisera and live antigens *J. clin. Microbiol.* 5(6): 640-9, 1977.
4. BRYAN, C.S.; REYNOLDS, K.L. & BRENNER, E.R. — Analysis of 1.186 episodes of Gram-negative bacteremia in nonuniversity hospitals: the effects of antimicrobial therapy. *Rev. infect. Dis.*, 5(4): 629-38, 1983.
5. COKER, A.O.; ANYIWO, C.E.; LAWAL, S.F.; OGUNBI, O.; LASI, Q.; DANIEL, S.O. & DAWODU, M. — Pyocin types of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from infections in Lagos University Teaching Hospital. *J. hosp. Infec.*, 3:87-9, 1982.
6. CROSS, A.; ALLEN, J.R.; BURKE, J.; DUCEL, G.; HARRIS, A.; JOHN, J.; JOHNSON, D.; LEW, M.; MacMILLAN, B.; MEERS, P.; SAKALOVA, R.; WENZEL, R. & TENNEY, J. — Nosocomial infections due to *P. pseudomonas aeruginosa*: review of recent trends. *Rev. infect. Dis.* 5 (Suppl. 5): 5837-45, 1983.
7. CRYZ Jr. S.J. — *Pseudomonas aeruginosa* infections. In: GERMANIER, R. ed. — *Bacterial vaccines*. New York, Academic Press, 1984, p. 317-51.
8. EDMONDS, P.; SUSKINL, R.R.; MacMILLAN, B.G. & HOLDER, I.A. — Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in a burns hospital: surveillance by a combined typing system. *Appl. Microbiol.* 24 (2): 219-25, 1972.
9. FARMER III, J.J.; WEINSTEIN, R.A.; ZIERDT, C.H. & BROKOPP, C.D. — Hospital outbreaks caused by *Pseudomonas aeruginosa*: importance of serogroup 0:11. *J. clin. Microbiol.*, 16 (2): 266-70, 1982.
10. FYFE, J.A.M.; HARRIS, G. & GOVAN, J.R.W. — Revised pyocin typing method for *Pseudomonas aeruginosa*, *J. clin. Microbiol.* 20 (1):47-50, 1984.

11. GOVAN, J.R.W. — Pyocin typing of *Pseudomonas aeruginosa*, *Methods Microbiol.*, 10:61-91, 1978.
12. GOVAN, J.R.W. & GILLIES, R.R. — Further studies in the pyocine typing of *Pseudomonas pyocyanea* *J. med. Microbiol.* 2: 17-25, 1969.
13. HECKMAN, M.G.; BABVCOCK, J.B. & ROSE, H.D. - Pyocine typing of *Pseudomonas aeruginosa*: clinical and epidemiologic aspects. *Am. J. clin. Path.* 57:35-42, 1972.
14. JELLARD, C.H. & CHURCHER, G.M. — An outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* (*pyocyanea*) infection in a premature baby unit, with observations on the intestinal carriage of *Pseudomonas aeruginosa* in the newborn. *J. Llyg.*, 65: 219-28, 1967.
15. KLASTUSKY, J. — Nosocomial infections due to Gram-negative bacilli in compromised host: considerations for presentation and therapy. *Rev. infect. Dis.* 7 (Suppl. 4): 5552-8, 1985.
16. KOMINOS, S.D.; COPELAND, C.E.; GROSIK, B. & POSTIC, B. — Introduction of *Pseudomonas aeruginosa* into a hospital via vegetables. *Appl. Microbiol.*, 24 (4): 567-70, 1972.
17. LANYI, B. & BERGAN, T. - Serological characterization of *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods Microbiol.* 10:93-168, 1978.
18. LEGAKIS, N.J.; ALIFEROPOULOU, M.; PAPAVALIIOU, J. & PAPANIKOLAOU, M. — Serotypes of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical specimens in relation to antibiotic susceptibility, *J. clin. Microbiol.*, 16 (3): 458-63, 1982.
19. LIU, P.V.; MATSUMOTO, H.; KUSAMA, H. & BERGAN, T. — Survey of heat-stable, major somatic antigens of *Pseudomonas aeruginosa*, *Int. J. syst. Bacteriol.* 33 (2): 256-64, 1983.
20. MORRISON JR., A.S. & WENZEL, R.P. — Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*, *Rev. Infect. Dis.*, 6 (Suppl.3): 5627-42, 1984.
21. NAKAHARA, H. & KOZUKUE, H. — Isolation of chlorhexidine-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from clinical lesions. *J. clin. Microbiol.*, 15(1): 166-8, 1982.
22. NEW, H.C. — Infections due to Gram-negative bacteria: an overview. *Rev. infect. Dis.*, 7 (Suppl.4): 5778-82, 1985.
23. PALLERONI N.J. — Genus I — *Pseudomonas* *Mi-gula* 1894, 237^{AL}. In: BERGEY'S manual of systematic bacteriology, Baltimore, William & Wilkins, 1986. p. 141-99.
24. REYNOLDS, H.Y.; LEVINE, A.S.; WOOD, R.E.; ZIERDT, C.H.; DALE, D.C. & PENNINGTON, J.E. — *Pseudomonas aeruginosa* infections: persisting problems and current research to find new therapies. *Ann. intern. Med.* 82: 819-31, 1975.
25. SHERERTZ, R.J. & SARUBBI, F.A. — A three years study of nosocomial infections associated with *Pseudomonas aeruginosa* *J. clin. Microbiol.* 18 (1): 160-4, 1984.
26. VEGA, C.C.; CHÁVEZ, J.; PADILLA, M.E.; RIVERA, A.N. & VACA, S. — Piocin types of clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Mocrlia, Mexico (1980-1984). *Rev. latinoam. Microbiol.* 28: 287-91, 1986.
27. WAHBA, A.H. — Hospital infection with *Pseudomonas pyocyanea*: an investigation by a combined pyocine and serological typing method. *Br. med. J.*, 1: 86-9, 1965.
28. WAHBA, A.H. — Pyocine typing of *Pseudomonas pyoceanea* and its relation to serological typing. *Zentralbl. Bakteriol. I. Abt. Orig.* 196: 389-94, 1965.
29. WHITBY, J.L. & RAMPLING, A. — *Pseudomonas aeruginosa* contamination in domestic and hospital environments. *Lancet*, 1 (7740): 15-7, 1972.

Recebido para publicação em 7 de junho de 1989.