

Registra de Casas

VERIFICAÇÃO DE *FLAVOBACTERIUM MENINGOSEPTICUM* KING, 1959, EM SÃO PAULO (BRASIL)

Carlos SOLÉ-VERNIN⁽¹⁾, Cecília Mattos ULSON⁽²⁾ e Milton ZUCCOLOTTO⁽³⁾

RESUMO

Flavobacterium meningosepticum King, 1959, nova espécie associada a meningites infantis, esporádicas ou de surtos epidêmicos, foi verificada em São Paulo, como agente etiológico de meningite em recém-nascido prematuro. O diagnóstico bacteriológico é minuciosamente discutido.

INTRODUÇÃO

Numa comunicação feita à Secção de Pediatria da Associação Paulista de Medicina, ZUCCOLOTTO & SOLÉ-VERNIN⁴ tiveram a oportunidade de discutir aspectos sobretudo clínicos de um caso de meningite com hidrocefalia, em recém-nascido prematuro, produzida pelo *Flavobacterium meningosepticum*, nome proposto por KING³ para um novo agente etiológico e que, naquela ocasião, era identificado pela primeira vez em São Paulo. Nos Estados Unidos as infecções apresentavam dois aspectos epidemiológicos (BRODY, MOORE & KING¹): infecções esporádicas e surtos epidêmicos.

Como se trata de uma espécie bacteriana patogênica de reconhecimento muito recente, resolvemos, nesta nota, depois do resumo clínico do caso, expor alguns pormenores atinentes ao diagnóstico bacteriológico, sobretudo no que diz respeito às características fundamentais da nova espécie e ao seu diag-

nóstico diferencial frente a outras com as quais poderia apresentar alguma semelhança.

RESUMO CLÍNICO

Identificação — Recém-nascido, feminino, branco, reg. nº 32.164, internado no Berçário da Clínica Pediátrica do Hospital das Clínicas (Serviço do Prof. P. de Alcântara).

História progressa — Segundo filho de mãe com 23 anos. Durante o trabalho de parto, as condições maternas eram boas e as condições fetais regulares. Idade fetal de 28 semanas. Parto normal, a 29-3-1959. Apresentação cefálica, chorou no primeiro minuto após o nascimento. Não houve manobras de ressuscitação.

Exame físico inicial — 30-3-1959. Estado geral regular. Gemente. Moro presente. Preensão presente. Sucção esboçada. Cianose das extremidades. Estatura: 45,5 cm; pêso: 1.610 g; perímetro cefálico: 34 cm; biparietal: 7,5 cm; occipito-frontal: 10,5 cm; perímetro torácico: 28 cm; perímetro abdominal: 30 cm.

Evolução — Nos dias subsequentes a criança continuou gemente, prostrada. Apresenta-

Dept. Microbiol. e Imunol. da Fac. Med. U.S.P. (Prof. C. S. Lacaz) e da Clín. Pediátrica do Hosp. das Clínicas (Prof. P. de Alcântara).

⁽¹⁾ Assistente e Chefe da Secção de Bacteriologia.

⁽²⁾ Biologista.

⁽³⁾ Médico Auxiliar da Clín. Pediátrica.

tou icterícia, períodos de recusa de alimento, crises de apnéia, hipertonia e temperatura.

Em 10-4-59, foi feito exame de líquido, no Hospital das Clínicas, com o seguinte resultado:

Punção — SOD
Condições — choro
Aspecto — turvo-xantocrômico

Citologia:

Hemácias — 0
Leucócitos — 900
Linfócitos — 30%
Monócitos — 10%
Neutrófilos — 60%

Glicose — 12 mg%
Pandy — ++

Sedimento — Mucopurulento. Flora bacteriana abundante, representada por bacilos e coco-bacilos Gram-negativos, com morfologia de *Haemophilus*.

O prematuro recebeu Cloranfenicol, Novobiocina, Sulfadiazina e Iloticina. Os exames de líquido continuaram com o mesmo aspecto turvo-xantocrômico, grande aumento de células, com predomínio de neutrófilos, açúcar e cloretos baixos e proteínas altas. Em 19-5-59 o perímetro cefálico passou a 35 cm e a 25-5-59 alcançou 36,5 cm.

Medicada com Novobiocina oral e Eritromicina intramuscular, de acordo com o antibiograma, persistiram as alterações líquóricas, continuando o aumento do perímetro cefálico da criança que atingiu 40 cm a 30-6-59. Nessa ocasião, tendo em conta um exame de transluminação realizado, suspeitou-se de anencefalia. Um eletrencefalograma feito evidenciou atividade elétrica ao nível de todos os eletrodos utilizados. Em 17-7-59 a cultura do líquido resultou negativa. A criança obteve alta, a 28-8-59, da Clínica de Moléstias Tropicais e Infecciosas, para onde fora transferida, tendo 5 meses, pesando 2.970 g, o perímetro cefálico medindo 44 cm, e apresentando quadro clínico de rigidez descebrada.

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO

O líquido apresentava-se muito turvo. O exame microscópico do sedimento do líquido, corado pelo método de Gram, revelou pió-

citos polimorfonucleares e freqüentes bastonetes finos Gram-negativos, alguns fagocitados. O aspecto era altamente sugestivo de *Haemophilus*, e, esperando encontrar talvez o *Haemophilus influenzae*, foi feita cultura em ágar-infusão de coração com sangue de coelho a 20%. O aspecto da lâmina de sedimento do líquido corado pelo Gram correspondia a aspectos habituais, de modo que não ocorreu, naquele momento, a importância que poderia ter a sua conservação como documento bacteriológico.

A incubação da placa deu colônias pequenas, não β -hemolíticas, em cultura pura, de um germe que ainda poderia ser o *Haemophilus influenzae*, mas, um cultivo que simultaneamente tinha sido feito em caldo simples, deu, também, excelente crescimento. Afastada a hipótese de *Haemophilus* inclusive de *Bordetella pertussis*, que também exige hemina e coenzima ao isolamento, na fase I, pensou-se em alguma enterobactéria. Foi então feita a série de testes bioquímicos que habitualmente se emprega para esse grupo, e observou-se que, apesar do meio básico ser suficiente para promover o crescimento do germe em questão, não houve a produção de ácido em nenhum dos "açúcares" empregados, após 24 horas de incubação, mesmo na dextrose. Afastou-se, por isso, a hipótese de *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia*, etc. Poderia tratar-se de *Alcaligenes*, *Pseudomonas* ou, então, de algum membro daquele grupo mal estudado de Gram-negativos que inclui os gêneros *Herellea*, *Mima* e *Colloides*; mas, entre outras diferenças, tal como *Salmonella* (na imensa maioria dos casos), estes germes são indol-negativos, ao passo que o germe em identificação era indol-positivo.

Em resumo, segundo KING³, *Flavobacterium meningosepticum* é bastonete fino, Gram-negativo, imóvel, nitrato negativo, indol positivo (caráter importante e crítico), proteolítico e produz ácido, tardiamente, a partir de alguns carboidratos, por processo oxidativo. No quadro I podem verificar-se alguns subsídios para o diagnóstico diferencial.

BRODY, MOORE & KING¹ consignam que o germe era lento fermentador de alguns carboidratos, necessitando de 1 a 3 semanas para formação de ácido. Como a fermentação é um processo metabólico anaeró-

QUADRO I

Subsídios para o diagnóstico diferencial, por meio de alguns caracteres genéricos, entre *Flavobacterium meningosepticum* e outras espécies bacterianas

Gêneros	Caracteres diferenciais
<i>Salmonella, Shigella, Escherichia, etc.</i>	Glicose fermentada em 24 horas
<i>Haemophilus</i>	Exige sempre fatores X e V Nitrato positivo (<i>influenzae</i> , etc.) Indol negativo (várias espécies) Gelatina negativa (várias espécies)
<i>Bordetella</i>	Exige fatores X e V ao isolamento (morfologia cocóide) Não proteolítico Indol negativo Não ataca açúcares Citrato e uréia positivos (<i>parapertussis</i>) Móvel (<i>bronchiseptica</i>)
<i>Brucella</i>	Glicose fermentada e uréia positiva
<i>Alcaligenes</i>	Pigmento negativo Indol e gelatina negativos
<i>Pseudomonas</i>	Pigmento positivo (azul-esverdeado); Indol e gelatina negativos
(Tribo <i>Mimae</i>)	
<i>Herrellea, Mima</i> e <i>Colloides</i>	Indol negativo (<i>Mima</i> , cocóide)

bico, em nossas primeiras experiências os tubos de cultura foram tamponados à parafina com o objetivo de apressar o possível ataque a êsses substratos (os empregados foram: dextrose, lactose, sacarose, manita, maltose e xilose). Apesar dêsse artifício de técnica, mesmo ao fim de 3 semanas de incubação (limite máximo em que alguns resultados deviam positivar-se), os testes continuavam negativos e assim permaneciam até a 5ª semana de incubação. Salvo essa aparente exceção (logo esclarecida, como adiante será exposto), o protocolo das características morfológicas, tintoriais e fisiológicas da bactéria isolada ficava consistente com a hipótese de tratar-se da nova espécie.

Em resumo: bastonete mais ou menos longo (6 a 12 micra, em média), fino, Gram-negativo, imóvel; cresce bem nos meios comuns básicos de cultura, aeróbio, catalase intensamente positiva; em 24 horas, dá colônias pequeníssimas em Mac Conkey e Teague, mas não cresce em SS (Difco); cresce

bem no meio de Surraco-Violeta, sem alterá-lo; não fermenta os "açúcares" comumente empregados no diagnóstico de enterobactérias; VM e VP, ambos negativos; crescimento em meio de citrato (Simmons), duvidoso a negativo; nitrato negativo; indol positivo fraco; urease negativo; H₂S negativo em ágar-acetato, mas positivo fraco na tira de papel impregnado de acetato; intensamente proteolítico (gelatina e leite); pigmentação amarelada com o prolongamento da incubação, bem visível no leite, que é peptonizado; hemólise esverdeada em ágar-infusão-sangue de coelho, quase adstrita ao local ocupado pela colônia.

O antibiograma do germe aqui isolado também corresponde, em linhas gerais, ao achado por KING: o germe é muito resistente aos antibióticos; resistente à penicilina, cloromicetina, tetraciclina, terramicina, aureomicina, nitrofurazone e kanamicina; sensível à iloticina e novobiocina.

KING³ fez estudo minucioso da fisiologia da nova espécie; apresentou relatório preliminar de sua classificação antigênica em, pelo menos, três diferentes tipos sorológicos; e, finalmente, propôs-lhe o nome de *Flavobacterium meningosepticum*. As observações sobre a fisiologia do microrganismo vieram revelar um fato de importância decisiva, a saber, o metabolismo oxidativo (e não, fermentativo) na utilização dos carboidratos: a expressão *processo oxidativo* substitui neste segundo trabalho, a de *fermentação*, que aparecia no primeiro. Por conseguinte, o tamponamento dos tubos de cultura com parafina, como havíamos feito inicialmente, estava contra-indicado, e, nessas condições, é certo que os carboidratos seriam atacados com maior dificuldade, mesmo porque o meio de cultura empregado ainda era semi-sólido; de fato, como já consignamos, mesmo ao fim de 5 semanas, não verificamos o menor grau de acidez. Por isso recorremos a uma nova técnica, agora para comprovar o processo oxidativo, empregando a dextrose (que seria positiva) e a sacarose (que seria negativa) nas concentrações de 1 e 5%. O resultado começou a positivar-se às 48 horas de incubação, sendo francamente positivo às 72 horas. A técnica empregada foi a HUGH & LEIFSON², modificada, pelo fato de termos inclinado os tubos para manter grande superfície líquida em contato com o ar contido nos tubos. Ficou, dêsse modo, esclarecida a aparente exceção nas características do germe aqui encontrado, com relação ao descrito por BRODY, MOORE & KING³.

O germe foi isolado em São Paulo, por duas vezes, da mesma paciente: a primeira a 29 de maio e a segunda, a 3 de julho de 1959. A 17-7-59 uma nova tentativa de isolamento foi negativa.

Enviamos uma amostra dêsse germe a Miss King (C.D.C., Chamblee, Georgia) para que tivesse a gentileza de verificar o nosso diagnóstico e, sobretudo, para classificação antigênica. Obtivemos a confirmação do diagnóstico e a informação de que a amostra brasileira não pertence a nenhum dos três tipos sorológicos americanos, havendo, entretanto, aglutinação lenta nos três soros específicos, interpretada como do tipo "O".

DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

Fêz-se uma investigação de anticorpos específicos no sôro da paciente (colhido a 2 de julho), na forma que a seguir se resume. Adotaram-se dois tipos de aglutinação: em lâmina (sôro não diluído) e em tubos.

A aglutinação em lâmina, com sôro inativado da paciente, deu 4 cruces de positividade (aglutinação rápida, grumos grandes); com sôro não inativado, apenas 2 cruces. O sôro inativado da mãe da paciente deu 1 cruz; seis outros soros inativados, de pessoas aparentemente normais, deram: 2, negativos; 3, 1 cruz e 1, duvidoso.

Com sôro inativado e não inativado da paciente, foram também feitos testes de aglutinação em tubos, sendo as diluições finais sempre dobradas, de 1/10 até 1/2.560. Quanto aos tipos de incubação, foram feitos dois, um a 48°C (banho-maria), durante 24 horas; e outro, a 37°C (estufa) por 2 horas e a seguir a 4°C (geladeira), até o dia seguinte. Quanto aos tipos de antígenos, também dois foram usados: um, suspensão viva do germe de cultura recente em ágar-infusão-sangue, e outro, a mesma suspensão referida, morta pelo banho-maria fervente durante 10 minutos.

Dessas oito combinações, só duas deram resultado positivo: aquelas em que o antígeno era vivo e a incubação a 48°C, quer com sôro inativado, quer sem inativar. Os tubos controles apresentaram-se em boas condições. Verificou-se aglutinação macroscópica, confirmada ao microscópio, até a diluição final de 1/320. Na série do sôro não inativado, observou-se lise quase completa no 1º tubo. Os resultados positivos dos testes de aglutinação foram interpretados como devendo-se a aglutinação do tipo "K" e não do tipo "O".

SUMMARY

Verification of "Flavobacterium meningosepticum" King, 1959, in São Paulo, Brazil.

Flavobacterium meningosepticum King, 1959, new species associated with sporadic or epidemic meningitis in infants, was found in São Paulo (Brazil), as the etiologic agent

of a premature newborn meningitis. The bacteriologic diagnosis is fully discussed.

AGRADECIMENTOS

Os autores desejam expressar o seu muito penhorado agradecimento a Miss Elizabeth O. King (C.D.C., Chamblee, Georgia) pela gentileza que teve, na confirmação do diagnóstico bacteriológico.

REFERENCIAS

- 1 — BRODY, J. A.; MOORE, H. & KING, E. O. — Meningitis caused by an unclassified Gram-negative bacterium in newborn infants. A.M. A.J. Dis. Child. 96:1-5, 1958.
- 2 — HUGH, R. & LEIFSON, E. — The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. J. Bact. 66:24-26, 1953.
- 3 — KING, E. O. — Studies on a group of previously unclassified bacteria associated with meningitis in infants. Am. J. clin. Path. 31: 241-247, 1959.
- 4 — ZUCCOLOTTO, M. & SOLE-VERNIN, C. — Sobre um caso de meningite em prematuro por germe recentemente classificado. Trabalho apresentado à Secção de Pediatria da Associação Paulista de Medicina, em 31 de agosto de 1959.

Recebido para publicação em 20 outubro 1959.