

## MENINGITE MENINGOCÓCICA: AVALIAÇÃO EM PERÍODO PRÉ-EPIDÊMICO E EPIDÊMICO NO RIO DE JANEIRO (1973-1975) \*

Nélson Jerônimo Lourenço, João Ramos Costa Andrade, Alexandre Ad'ler Pereira, José Augusto Adler Pereira, Maria Cristina Maciel Plotkovski, Paulo Peixoto de Araújo, Maria Lúcia de Barcellos Pereira, Ricardo Marques Dias, José Francisco de Melo, Frederico Rangel Araújo, Leyla Carvalho Gomes, Luiz André Viana Fernandes e Ítalo Suassuna

*São relatadas observações acumuladas nos períodos pré-epidêmico e epidêmico (1973-1975) do atual surto de meningoencefalite meningocócica na área do Grande Rio, e realizados estudos bacteriológicos baseados em 1.000 casos suspeitos de meningoencefalite e submetidos à punção lombar, no Hospital Estadual São Sebastião.*

*É proposto e discutido esquema simples e eficaz para processamento bacteriológico dos LCR suspeitos, a partir da colheita e pronta sementeira do material. É também discutida a real contribuição da bacterioscopia no diagnóstico presuntivo das meningoencefalites, definindo-se as limitações da técnica.*

*Foi obtido elevado grau de isolamento de microorganismos, variando de 3%, para líquidos entre zero e 10 células/mm<sup>3</sup> e 72%, para líquidos acima de 1000 células/mm<sup>3</sup>. No decorrer do estudo, foram isoladas e caracterizadas 356 amostras bacterianas, assim discriminadas: N. meningitidis, 281; Haemophilus sp., 22; Enterobacteriaceae, 15; D. pneumoniae, 26; bastonetes gram negativos oxidativos, 3; estreptococo beta hemolítico, 1 e enterococo, 1.*

*As amostras de meningococos eram, em 15% dos casos, do grupo sorológico A, em 2% do grupo B e em 14%, do grupo sorológico C.*

*Os testes de sensibilidade, em disco, aos agentes antimicrobianos principalmente utilizados na quimioprofilaxia e tratamento da doença meningocócica revelaram alto grau de sensibilidade das amostras ensaiadas a todos os agentes testados. A resistência à sulfadiazina sódica, em testes realizados segundo as normas preconizadas pela Food and Drug Administration (F.D.A.), revelaram elevado grau de resistência, particularmente dos meningococos do grupo C.*

### INTRODUÇÃO

No quadro das doenças transmissíveis, as meningoencefalites ocupam um lugar de destaque, tanto pela frequência como se manifestam e gravidade do estado clínico,

quanto pela possibilidade de ocorrerem em surtos epidêmicos.

Não apenas bactérias, mas toda uma considerável variedade de agentes infecciosos, como vírus, fungos e protozoários podem causar meningoencefalites, o que im-

\* Comunicação do Serviço de Microbiologia e Imunologia da U.E.R.J. e Hospital Estadual São Sebastião (Diretor: Dr. Waldyr Tavares, Diretor da Divisão Médica: Dr. Linandro Dias e Chefe do Laboratório de Patologia Clínica: Dr. Jayme Kac).

Recebido para publicação em 20.6.1975.

plica no uso de recursos laboratoriais apropriados para a definição etiológica da doença, conforme a suspeita clínica.

É definida a meningoencefalite bacteriana purulenta como inflamação aguda das membranas que recobrem o sistema nervoso central, com repercussões no encéfalo e na medula, assim como alterações mais ou menos características do líquido céfalo raquidiano (LCR) de onde se podem isolar bactérias causadoras da enfermidade (12).

Em 1970 e anos seguintes, a incidência de meningoencefalites no Estado da Guanabara permaneceu estável, sem grandes oscilações até o fim de 1973, excetuando dois pequenos surtos no ano de 1971, de janeiro a março e no mês de setembro. (Boletim Epidemiológico, SESP, 1974).

No entanto, a partir de 1971, comunicações provenientes de outros Estados, principalmente do sul do país, relatavam uma frequência da doença bem acima do limite máximo esperado, ocorrendo amplo predomínio de casos rotulados como meningite meningocócica.

No Grande Rio, que abrange as zonas urbanas e rurais da cidade do Rio de Janeiro e áreas limítrofes da baixada fluminense, o ano de 1974 caracterizou-se, no primeiro semestre, por oscilações acima do limite máximo esperado, ocorrendo, a partir de junho, um notável incremento do número de casos.

A maioria dos casos de meningoencefalites da área do Grande Rio é drenada para o Hospital Estadual São Sebastião da Secretaria de Saúde do Estado da Guanabara, que funciona como isolamento para doenças infecciosas e parasitárias para muitos pacientes provenientes de hospitais da rede estatal (federais e estaduais) e privados.

A partir do momento em que a doença mostrou tendência a elevar seus índices na nossa área, o Hospital Estadual São Sebastião e o Serviço de Microbiologia e Imunologia da Universidade do Estado da Guanabara coordenaram seus esforços, utilizando elementos comuns as duas instituições, visando o diagnóstico laboratorial, estudo dos agentes etiológicos e das populações acometidas.

Os processos infecciosos, como resultantes de múltiplas causas e envolvendo agentes, hospedeiro e meio ambiente, constituem um sistema dinâmico, sujeito a múl-

tiplas variações, mormente em períodos epidêmicos, obrigando o investigador a uma contínua observação. As variações nem sempre são previsíveis, assim, o maior número possível de agentes deve ser controlado cuidadosamente, e não somente o responsabilizado pela ampla maioria de casos. Com esta visão e por tratar-se de problema de Saúde Pública, a rotina proposta para o diagnóstico etiológico de meningoencefalites bacterianas, fundamentou sua eficácia na simplicidade e rapidez do processamento efetuado. Com isto, visamos o diagnóstico não apenas de *N. meningitidis*, mas a discriminação de ampla margem de microrganismos passíveis de isolamento a partir do LCR dos pacientes atendidos.

Na presente publicação, relatamos as observações acumuladas no período pré-epidêmico e epidêmico (1973-1975) do surto de meningite meningocócica no Grande Rio, referentes a pacientes atendidos, submetidos à punção lombar e eventualmente internados no Hospital Estadual São Sebastião (HESS).

## MATERIAL E MÉTODOS

**Pacientes:** Utilizamos os registros do laboratório de Bacteriologia do HESS, referentes aos anos de 1973 e 1974, para obter as frequências mensais de punções e exames que apresentavam celularidade alterada (mais de 10 células/mm<sup>3</sup>, na contagem global). Consideramos úteis estes dados para realizar uma estimativa mensal do número de casos suspeitos (pacientes punccionados) e número provável de pacientes com meningoencefalites (LCR com mais de 10 células/mm<sup>3</sup>).

Entre 21 de setembro de 1974 e 17 de janeiro de 1975, foram atendidos, com suspeita de meningoencefalite e submetidos à punção lombar, 1.000 pacientes.

Na admissão, colhemos os dados de identificação e anotamos o aspecto macroscópico do LCR (claro, opalescente, turvo, purulento e hemorrágico). Especial atenção foi dedicada a ocorrência de acidentes de punção, com passagem de sangue ao líquor, no momento da colheita.

**Processamento do material:** Imediatamente após a colheita, o LCR era encaminhado ao laboratório e submetido a exames citológicos, bioquímicos e bacteriológicos.

O exame citológico consistiu na contagem celular global e específica, pelos métodos convencionais, sendo os resultados expressos, respectivamente, em termos de leucócitos/mm<sup>3</sup> e percentuais relativos de linfócitos e/ou polimorfonucleares.

A bacterioscopia era realizada a partir do sedimento obtido pela centrifugação do LCR a 3.000 rpm, por 20 minutos. Espalhada uma gota em lâmina adequadamente limpa, era o esfregaço fixado pelo calor e corado pelo método de Gram (modificação de Kopeloff-Beerman), de acordo com Cohn, Bartholomew & Jennison (8). Tão logo obtido, o resultado do exame bacterioscópico era enviado à enfermaria.

A cultura era feita a partir do sedimento do LCR, colhido com pipeta estéril (0,1 a 0,2 ml.) e espalhado na superfície dos meios de cultura com a própria extremidade da pipeta. O tempo decorrido entre a colheita e semeadura do LCR situou-se entre 30 minutos até um máximo de 1 hora.

Os cultivos foram efetuados nos meios "Columbia Agar Base" (BBL) com sangue de carneiro a 5%, chocolateado, suplementado com "Isovitalex-enrichment" (BBL) ou com suplemento de Lankford, a 2% (16) e agar Levinthal (2), de particular importância no isolamento de hemófilos.

Ambos os meios eram distribuídos, em camada inclinada, por tubos 16x180, que, uma vez semeados, eram incubados em estufa bacteriológica, em lata hermeticamente fechada, na qual estabelecíamos atmosfera de CO<sub>2</sub> (de 3 a 4%) pela queima de uma vela e condições satisfatórias de umidade graças a pequeno recipiente contendo algodão embebido em água. As culturas negativas eram observadas por até 48 horas, após o que eram descartadas.

A identificação dos microrganismos iniciava-se pela observação das características coloniais, presença e tipo de hemólise e ocorrência e abundância de crescimento em um ou em ambos os meios de cultura. Em prosseguimento, era realizado o teste da oxidase, por modificação da técnica de Kovacs, consistindo em espalhar, sobre pequena área em papel de filtro, uma colônia do germe, pingando em seguida, uma gota de solução 0,5 a 1% de oxalato de paradimetil fenileno diamina (DIFCO).

As características morfo-tintoriais eram então apreciadas pela observação micros-

cópica de esfregaços corados pelo método de Gram (modificação de Kopeloff-Beerman).

Os diagnósticos bacteriológicos efetuados obedeceram aos seguintes critérios:

*Neisseria meningitidis*: diplococos gram negativos, oxidase positivos e com provas de fermentação de carboidratos, realizadas em tubos com 3 ml. de "Cystin Trypticase Agar" (BBL) com 1% de glicose, sacarose, maltose e lactose, apresentando reações positivas para a glicose e maltose.

As amostras de *N. meningitidis* assim definidas foram repicadas em agar Mueller-Hinton (BBL) sangue de carneiro a 5% ou em GC agar com 2% de suplemento de Lankford (16), mantidas a 37°C por 24 horas, em atmosfera de CO<sub>2</sub> e então realizada a sorologia por técnica de aglutinação em lâmina, utilizando soros anti-meningococos grupos A, B e C (Institute Pasteur, Paris). Consideramos duas categorias de amostras não grupadas: as auto-aglutináveis — que aglutinaram quando testadas em solução salina — e as não grupáveis — que não aglutinaram com quaisquer dos soros testados.

*Pneumococos*: diplococos gram positivos, causando alfa-hemólise (em agar sangue) e descoramento no meio C.A.B. Semeados em agar sangue, apresentaram positividade ao teste de inibição do crescimento pela optoquina (cloreto de etil hidro-cupreína), em discos de 50 µg.

*Enterobactérias e Pseudomonas sp.*: bastonetes gram negativos, que repicados em agar eosina-azul de metileno (DIFCO) apresentaram crescimento, sendo o teste da oxidase, se positivo, indicativo de *Pseudomonas* ou alguns outros grupos bacterianos (17). Os bastonetes gram negativos cujo teste da oxidase mostrou-se negativo, eram então submetidos aos testes de fermentação da lactose e glicose, utilização da uréia, produção de H<sub>2</sub>S e indol e prova da mobilidade, conforme o esquema sumário de identificação de enterobactérias proposto por Suassuna & Suassuna (24).

*Hemófilos*: bastonetes gram negativos, frequentemente pleomórficos, não crescendo em meio de agar eosina-azul de metileno (DIFCO) e apresentando crescimento em agar Levinthal. Repicados em placas de agar Mueller-Hinton (BBL) sangue de car-

neiro a 5%, apresentaram teste de satelitismo (2) positivo. A cultura de estafilococo utilizada como fonte de fator V correspondeu a amostra *Staphylococcus aureus* 6538 P (ATCC).

Os cocos gram positivos da família *Micrococaceae* (*Staphylococcus* e *Micrococcus*) e os *Streptococcus* alfa hemolíticos, foram rotineiramente considerados como germes de contaminação.

#### Testes de sensibilidade aos agentes antimicrobianos:

**Difusão em agar:** utilizamos o meio de Mueller-Hinton (BBL) sangue de carneiro a 5%, distribuído em placas de Petri, na espessura de 5 mm, e adotando, nos testes, afastamento, entre os discos, de 3 cm. e destes à borda da placa, a distância de 2 cm.

Os inóculos foram padronizados para a obtenção de crescimento quase confluyente, pela diluição de uma alçada do crescimento de 24 hs. em caldo Mueller-Hinton (BBL), em 3 ml. de solução salina. As placas eram então semeadas com "swab" embebido na suspensão em salina e pressionado nas paredes do tubo, visando retirar o excesso de líquido.

Foram utilizados os seguintes antimicrobianos: Penicilina G, Cloranfenicol, Ampicilina, Kanamicina, Gentamicina, Cefalotina, Rifampicina, Minociclina e Sulfadiazina. A metodologia adotada, concentrações de antimicrobianos nos discos e critérios de interpretação dos testes foram os propostos pela "Food and Drug Administration" (3).

**Sensibilidade à Sulfadiazina por diluição em placas:** usamos o meio utilizado para o teste de difusão em agar, adicionado do sal sódico de sulfadiazina (Farmitália), nas concentrações finais de 1,0; 10,0 e 100,0 µg/ml.

Os inóculos utilizados foram análogos aos adotados no teste de difusão em agar, sendo cada amostra semeada em placas adicionadas de sulfadiazina e placas de controle, destituídas do antimicrobiano. Só foram consideradas sensíveis as amostras que, crescendo no controle, mostraram ausência do meio adicionado de sulfa, após 24 horas de incubação em atmosfera de CO<sub>2</sub>.

## RESULTADOS

No período referente ao presente estudo, seguindo a rotina descrita, isolamos 356 amostras bacterianas, correspondentes aos seguintes diagnósticos: *Neisseria meningitidis*, 281; pneumococos, 26; bastonetes gram negativos, 18; hemófilos, 22; estreptococo beta-hemolítico, 1 e enterococo, 1 amostra.

Considerando a idade dos pacientes (Tabela I) e o isolamento de *N. meningitidis*, encontramos 83% de casos no grupo etário de 0 — 25 anos, concentrando-se o maior número de casos entre os 6 — 10 anos. Quanto aos pneumococos, 42% dos casos ocorreram no grupo de 0 — 1 ano, ainda ocorrendo isolamentos até os 20 anos, e dois casos, tanto na faixa de 31 — 35 anos quanto em 41 — 45 anos. Dos achados de hemófilos, 63% situaram-se no grupo de 0 — 1 ano, 6 casos entre 2 — 10 anos, e dois casos de isolamento em pacientes com idades de 23 e 58 anos. No que se refere aos bastonetes gram negativos, em quase 50% dos casos foram isolados do grupo de 0 — 1 ano, em 22% dos casos entre 2 — 10 anos e os demais, distribuídos entre os grupos etários restantes.

A frequência de definição etiológica, considerada a citometria global, foi de 3% nos LCR entre 0 — 10 cels./mm<sup>3</sup>, de 16% entre 11 — 1000 cels./mm<sup>3</sup> e 72% naqueles acima de 1000 cels./mm<sup>3</sup> (Tabela II).

Quanto à procedência dos pacientes dos quais isolamos *N. meningitidis*, 58% residem na Guanabara, 38,5% no Estado do Rio de Janeiro e 3,5% não tiveram apurada sua residência (Tabela III).

Das amostras de *N. meningitidis* isoladas, 144 (51%) pertencem ao grupo sorológico A, 5 (2%) ao grupo B, 42 (14%) ao grupo C e 12 (4%) consideradas não tipáveis pelos soros disponíveis (Tabela IV).

Os resultados do teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos, em disco, revelaram, em 44 amostras de *N. meningitidis* testadas, sensibilidade a todos os agentes utilizados, exceto 1 amostra de moderada sensibilidade e 1 amostra resistente à Kanamicina (Tabela V).

Quanto aos testes em placa, com diluições de sulfadiazina, de 96 amostras de meningococos, 100% foram sensíveis a con-

Tabela I — Correlação entre grupo etário e isolamento de microrganismos do LCR.

Grupo etário (anos)	Microrganismos			
	Neisseria	Pneumococo	Hemófilo	BGN *
0 — 1	19	11	14	9
2 — 5	44	2	4	2
6 — 10	60	2	2	2
11 — 15	43	3	—	—
16 — 20	41	2	—	—
21 — 25	25	—	1	—
26 — 30	14	—	—	1
31 — 35	9	2	—	1
36 — 40	8	—	—	—
41 — 45	2	2	—	—
46 — 50	5	—	—	1
51 e mais	5	—	1	2
ignorado	6	2	—	—
<b>TOTAL</b>	<b>281</b>	<b>26</b>	<b>22</b>	<b>18</b>

\* enterobactérias e bastonetes gram negativos oxidativos.

centrações de 100 µg/ml, 100% resistentes à 1 µg/ml. e 44% sensíveis a 10 µg/ml. (Tabela VI).

As taxas de resistência à sulfadiazina, conforme o grupo sorológico de meningococo (A, B e C), foram de 20,5% no grupo A, 66% no grupo B, 98% no grupo C e 50% na categoria das não grupadas (autoaglutináveis e não tipáveis), conforme a Tabela VII.

Observando a distribuição mensal de casos, verificamos que, de janeiro de 1973 a junho de 1974, ocorreram entre 29 e 67 casos suspeitos de meningoencefalite. Neste mesmo período, a frequência de casos internados variou entre 26 a 48 casos por mês, com exceção de julho de 1973, onde ocorreram cerca de 2 internações por dia. A partir de julho de 1974, o número de casos por dia elevou-se, sendo de 2,5 casos em média naquele mês, e atingindo o clímax em janeiro de 1975, com a média de 10 casos puncionados e 6 internados, por dia. Em fevereiro sucedeu notável declínio na frequência de casos suspeitos e casos internados (média de 4 punções e 3 internações, por dia), o que corresponde a menos da metade das ocorrências de janeiro (Gráfico I).

## DISCUSSÃO

*Exame bacterioscópico do LCR:* Em decorrência da possibilidade de obter-se diagnóstico etiológico precoce, visando instalação de terapêutica específica e avaliação da evolução e prognóstico clínicos, tornou-se rotineiro, no processamento laboratorial das meningoencefalites, a observação microscópica do sedimento do LCR, geralmente corado pelo método de Gram e suas variações ou pelo azul de metileno, com a finalidade precípua de pronta resposta ao clínico (5, 6).

No entanto, mesmo considerando a sua feitura dentro de todos os critérios técnicos aconselháveis, é fato estabelecido as limitações que a bacterioscopia do LCR apresenta. Estas decorrem, basicamente, de erros de observação e interpretação decorrentes de variações da afinidade bacteriana aos corantes, pleomorfismo dos microrganismos, interferência de restos celulares na visualização das bactérias ou ações deletérias, por enzimas e produtos liberados nos exsudatos, sobre as características morfotintoriais dos microrganismos.

Tabela II — Correlação entre densidade celular dos LCR examinados e freqüência de isolamento de microrganismos.

Citometria global (células/mm <sup>3</sup> )	Número de casos	Microrganismos isolados				TOTALS
		<i>N. meningitidis</i>	<i>D. pneumoniae</i>	<i>Haemophilus sp.</i>	BGN *	
0 — 10	204	5 ( 2,5%)	1 (0,5%)	—	1 (0,5%)	7 ( 3% )
11 — 100	117	9 ( 7,5%)	2 (1,5%)	—	4 (3% )	15 (12% )
101 — 500	112	7 ( 6,5%)	6 (5,5%)	—	1 (1% )	14 (13% )
501 — 1000	69	9 (13% )	1 (1,5%)	6 (8,5%)	3 (4,5%)	19 (27,5%)
> 1000	388	247 (63,5%)	13 (3,5%)	16 (4% )	7 (2% )	283 (72% )
sem registro	110	4 ( 3,5%)	3 (3% )	—	2 (2% )	9 ( 8% )
<b>TOTALS</b>	<b>1000</b>	<b>281 (28% )</b>	<b>26 (3% )</b>	<b>22 (2% )</b>	<b>18 (2% )</b>	<b>347 (35% )</b>

\* Inclui enterobactérias e bastonetes gram negativos oxidativos.

Tabela III — Correlação entre isolamentos de *N. meningitidis* e local de domicílio dos pacientes.

Domicílio	Meningite meningocócica	(%)
Guanabara	163	58,0%
Rio de Janeiro	108	38,5%
Ignorado	10	3,5%
<b>TOTAL</b>	<b>281</b>	<b>100,0%</b>

Tabela IV — Discriminação sorológica das amostras de *N. meningitidis*

Grupo sorológico	N.º de amostras	(%)
A	144	51%
B	5	2%
C	42	14%
não-grupáveis	12	4%
auto-aglutináveis	43	15%
não testadas	35	12%
<b>TOTAL</b>	<b>281</b>	<b>100%</b>

Tabela V — Ação de vários antimicrobianos sobre 44 amostras de *N. meningitidis*, utilizando método de difusão em agar (Kirby & Bauer).

Agentes antimicrobianos	Amostras		
	Sensíveis n.º (%)	Moderada sensibilidade n.º (%)	Resistentes n.º (%)
PENICILINA G	44 (100)	0	0
KANAMICINA	42 (95)	1 (2,5)	1 (2,5)
CLORANFENICOL	44 (100)	0	0
AMPICILINA	44 (100)	0	0
RIFAMPICINA	44 (100)	0	0
MINOCICLINA	44 (100)	0	0
GENTAMICINA	44 (100)	0	0
CEFALOTINA	44 (100)	0	0
SULFADIAZINA	44 (100)	0	0

Tabela VI — Ação de diversas concentrações de sulfadiazina sódica sobre 96 amostras de *N. meningitidis*.

Amostras	Concentrações (µg/ml.)		
	1 n.º (%)	10 n.º (%)	100 n.º (%)
Resistentes	96 (100)	54 (56)	0
Sensíveis	0	42 (44)	96 (100)

Assim é que McCarty (19) e Briody (5) apontam, dentre algumas das causas de erro na avaliação bacterioscópica do LCR, a demora na fixação dos esfregaços, permitindo autólise de certos microrganismos, como neissérias, hemófilos, etc. Por outro lado, é conhecida a interferência nociva de radicais ácidos nas técnicas comuns de coloração, sendo esta condição normalmente encontrada em exsudatos, pelo acúmulo de ácido láctico e outros produtos (20).

Evidentemente, tais variáveis podem comprometer seriamente a fidelidade e credibilidade de diagnósticos etiológicos de meningoencefalites que se baseiem exclusivamente em achados bacterioscópicos, levando à confusão diagnóstica, má orientação clínica e erros na avaliação epidemiológica da doença.

Na Tabela VIII, podemos verificar que, dentre os três agentes bacterianos mais freqüentes em meningoencefalites, os diplo-

cocos gram negativos apresentam o maior percentual (51%) de achados concordantes entre bacterioscopia e cultura, bem como o maior percentual (38%) de bacterioscopias falso-negativas. Quanto aos dados de bacterioscopia conflitantes com o cultivo, variam de 16% para os diplococos gram negativos até 57% para os diplococos gram positivos. Desta forma, torna-se clara a nítida tendência da bacterioscopia, caso seja considerada como parâmetro suficiente para definir o diagnóstico etiológico, em atribuir falsas etiologias.

Por outro lado, se tomarmos em conjunto os achados conflitantes e os achados falso-negativos da bacterioscopia, verificaremos que a margem de erro da técnica é muito elevada, variando de 49% (diplococos gram negativos) a 71% (diplococos gram positivos). Assinala-se que os nossos achados de bacterioscopias falso-negativas são praticamente superponíveis aque-

Tabela VII — Freqüência de resistência à sulfadiazina sódica (10 µg/ml.) em relação ao grupo sorológico de meningococo.

	Grupos sorológicos				
	A	B	C	não-grupáveis	auto-aglut.
N.º de amostras	39	3	37	3	14
Resistentes	8	2	36	1	7
Freqüência de resistência (%)	20%	66%	98%	33%	50%

Tabela VIII — Comparação entre os resultados de bacterioscopia (Gram) e os achados de cultura, em 142 líquidos em que se isolou agente bacteriano.

Microrganismos isolados	N.º de culturas positivas	Bacterioscopias		
		concordantes	conflitantes	negativas
<i>N. meningitidis</i>	111	57 (51% )	18 (16 )	36 (33% )
<i>D. pneumoniae</i>	7	2 (28,5%)	4 (57% )	1 (14,5%)
bastonetes gram negativos *	24	10 (42% )	10 (42% )	4 (16% )
<b>TOTAL</b>	<b>142</b>	<b>69 (48,5%)</b>	<b>32 (22,5%)</b>	<b>41 (29% )</b>

\* incluem hemófilos, enterobactérias e bastonetes gram negativos oxidativos.

les citados por Bryodi, em 1974 (5), que publica resultados de 38% para diplococos gram negativos, 16% para bastonetes gram negativos e 14% para os diplococos gram positivos.

Para avaliarmos se as margens de erro detectadas seriam intrínsecas ao método ou decorrentes de falhas de observação ou de manipulação técnica, selecionamos 181 bacterioscopias de LCR com culturas negativas, realizadas no mesmo período e com os mesmos corantes e procedimentos técnicos adotados nos exames discriminados na Tabela VIII.

Em termos de densidade celular, tal amostragem de LCR era composta, em 49%, por líquidos entre 0 — 100 células/mm, em 28%, entre 101 — 1000 cels./mm<sup>3</sup> e em 23%, acima de 1001 cels./mm<sup>3</sup>. Em 70% destes líquidos, os resultados de bacterioscopia e cultura foram coincidentes (ambos negativos), o que atesta a qualidade técnica da observação e as limitações do método.

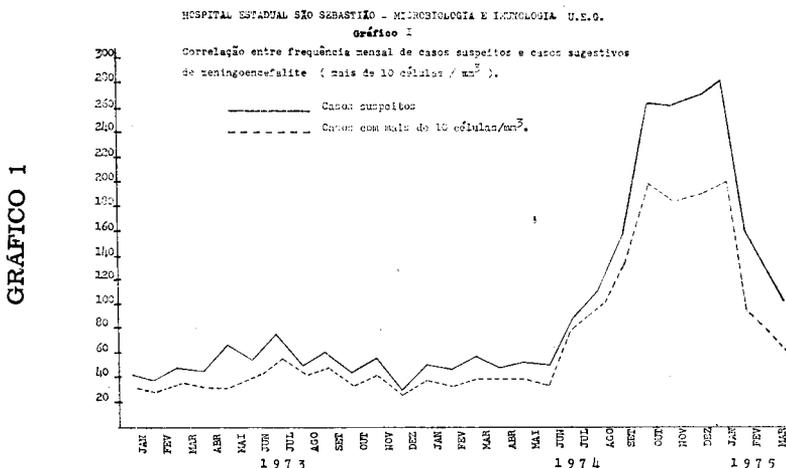
No que diz respeito à discriminação dos resultados de bacterioscopia conflitantes com a cultura (Tabela VIII), para os diplococos gram positivos, o erro consistiu, em 3 casos, em atribuir gram negatividade ao germe, e em seguida, enquadrá-lo na categoria morfo-tintorial mais semelhante e, numericamente, freqüente: "diplococos gram negativos". É sabida a acentuada tendência à gram-labilidade apresentada pelos pneumococos, que tendem a assumir, à semelhança

dos estafilococos, coloração gram negativa em exsudatos purulentos. Tal tendência é minimizada quando utiliza-se, como o fizemos rotineiramente, soluções de bicarbonato de sódio na coloração de Gram (modificação de Kopeloff-Beerman).

Quanto aos bastonetes gram negativos, em 6 casos, o erro consistiu em atribuir-lhes morfologia de "diplococos". Como já estabelecido na literatura, é acentuada a tendência do gênero *Haemophilus* ao pleomorfismo, com formas cocóides, delicadas e de coloração bipolar, causando, com freqüência, erros de apreciação (5, 27).

Em relação aos diplococos gram negativos, em 9 casos, os achados conflitantes de bacterioscopia e cultura resultaram de atribuir-se gram-positividade ao germe visualizado, e em 6 casos, confundiu-os com formas cocóides de bastonetes gram negativos.

*Cultura e identificação dos microrganismos isolados do LCR:* A escolha e forma de acondicionamento dos meios de cultura adotados orientou-se, fundamentalmente, em permitir o isolamento de ampla gama de agentes bacterianos causadores de meningococcal, promover vigoroso crescimento de germes considerados de difícil isolamento, como os do gênero *Haemophilus* e preencher requisitos de economia e simplicidade. A par destas vantagens, a constância das características culturais e padrão de crescimento apresentados nestes meios, pe-



los principais agentes bacterianos envolvidos no quadro infeccioso, permitia estabelecer diagnósticos presuntivos em tempo relativamente curto e com grande margem de acertos, com indiscutíveis benefícios para os pacientes.

Paralelamente à utilização de tal esquema, adotamos procedimentos que previam a semeadura do LCR em curto espaço de tempo após a colheita, pela atividade diuturna contínua, proximidade e integração do laboratório com as equipes de plantão na admissão de casos suspeitos.

A utilização de atmosfera de CO<sub>2</sub> para a incubação dos meios já semeados, revelou-se técnica bastante simples, barata e eficaz. Recentemente, James-Holmquist et al. (15), realizando estudo comparativo de algumas técnicas destinadas a fornecer a atmosfera de CO<sub>2</sub>, puderam verificar a nítida superioridade do método da vela sobre os demais, particularmente para representantes do gênero *Neisseria*. Por outro lado, a utilização de atmosfera de CO<sub>2</sub> a 3-4% é extremamente benéfica ao isolamento de hemófilos (2, 10, 27), de estreptococos (23) e de pneumococos (4), além de não interferir no crescimento de outros microorganismos encontrados em meningoenfalites purulentas.

No que diz respeito à utilização de tubos de 16x180 para acondicionar os meios, em superfície inclinada, embora não nos pareça ter interferido significativamente na eficácia do método, certamente não contribuiu para que fosse minimizado o problema de caracterização de contaminantes ou aumentadas as chances de isolamento em líquo-

res contendo poucos germes viáveis, o que poderia decorrer da utilização de placas de Petri.

Como demonstra a Tabela II, o esquema de processamento bacteriológico adotado permitiu-nos obter altos percentuais de isolamento de agentes bacterianos, particularmente na faixa de LCR com celularidade acima de 1001 células/mm<sup>3</sup>, bem como significativa taxa de isolamentos (3%) em LCR claros, com contagens celulares variando de zero a 10 células/mm<sup>3</sup>. Desta forma, parece-nos confirmar-se a validade do processamento bacteriológico de toda amostra de LCR, mesmo se definida macroscopicamente como "líquor claro", particularmente quando, na citometria, apresente granulócitos.

Quanto ao padrão de crescimento bacteriano nos meios utilizados, foi possível observarmos que, de 286 amostras de *N. meningitidis* isoladas de LCR, 71 (25%) cresceram exclusivamente em C.A.B., enquanto 215 (75%) desenvolveram-se igualmente bem agar Levinthal. Desta forma, ressaltamos a importância do meio C.A.B., em nossa rotina, ao suprir as exigências culturais de significativa parcela de amostras de *Neisseria meningitidis*.

No que diz respeito ao gênero *Haemophilus*, a utilização do agar Levinthal foi decisiva, permitindo, em quase todos os casos de isolamento do agente, crescimento vigoroso, confluyente ou em colônias bem individualizadas, em 24 horas ou menos. No entanto, em nenhum caso ocorreu, no meio C.A.B., crescimento marcante, em 24 horas, de hemófilos.

Uma vez isolados em agar Levinthal, eram os hemófilos repicados em placas de agar Mueller-Hinton sangue a 5% para a realização do teste de satelitismo, o que facultou-nos avaliar a eficácia do agar sangue em permitir o crescimento das amostras isoladas de LCR. Mesmo em 48 horas de observação, dentre 25 amostras assim repicadas, nenhuma delas desenvolveu-se, exceto em torno do ponto de inoculação e crescimento da cultura de *Staphylococcus aureus* 6538P.

Tais resultados apenas confirmam a literatura pertinente, pois, como salientam Alexander (2) e Young (27), quase todos os hemófilos, especialmente o mais freqüente em meningoencefalites (*Haemophilus influenzae*), requerem os fatores X e V para o seu crescimento, sendo recomendável o acréscimo, ao agar sangue, do fator V (difosfopiridina nucleotídeo — DPN). Continuam ainda os autores, ressaltando que particularmente na bacteriologia das meningoencefalites, o uso de agar Levinthal, para o isolamento de hemófilos, torna-se recomendável, pelas razões discutidas.

Quanto aos pneumococos, enterobactérias e demais microrganismos isolados de LCR, não detectamos nenhuma ação inibidora aparente dos meios de cultura, desenvolvendo-se igualmente bem em ambos os meios. Apenas cabe ressaltar que os pneumococos, quando crescendo em C.A.B., revelam aspecto colonial e padrão de hemólise bastante peculiares, orientando o diagnóstico presuntivo.

No que concerne à caracterização bioquímica das amostras de *N. meningitidis* isoladas, incluímos, na nossa rotina, o teste de fermentação de lactose em paralelo aos da glicose, maltose e sacarose. A utilização de lactose justifica-se, particularmente, na pesquisa de portadores, onde, mesmo utilizando-se meios adicionados de antibióticos, isola-se com freqüência *Neisseria lactamica*, cujo padrão bioquímico somente difere de meningococos pela fermentação da lactose ou utilização do ONPG (9, 14), além de reagir, a semelhança dos meningococos, com soros aglutinantes anti grupo B (7) e crescer em meios adicionados de inibidores, usados rotineiramente na pesquisa de meningococos (25).

Na realização dos testes de fermentação, em meio C.T.A., não procedemos à adição de soro de coelho, como classicamente des-

crita (26), não sucedendo, porém, em quase 200 amostras submetidas a estudo bioquímico, nenhuma que deixasse de desenvolver-se no meio. No entanto, utilizamos sempre inoculos generosos, com picadas pouco profundas (cerca de 1 cm.), e consideramos na maior parte dos casos as reações de 48 horas, cuja nitidez é apreciável.

Em relação aos bastonetes gram negativos suspeitos de pertencerem a família *Enterobacteriaceae*, uma vez submetidos aos testes bioquímicos sumários descritos por Suassuna & Suassuna, em 1969 (24), foram agrupados nos diversos gêneros e tribos que compõem a família. Assim, de um total de 15 amostras testadas, 6 (40%) correspondiam ao gênero *Proteus*, 4 (27%) a tribo *Klebsiellae*, 4 (27%) eram *Escherichia coli* e 1 (7%) a tribo *Salmonellae*.

Quanto aos bastonetes gram negativos que apresentaram reação positiva ao teste da oxidase, tiveram avaliadas as suas características bioquímicas de acordo com esquema proposto por King (17). Foram 3 as amostras assim estudadas, sendo duas delas reconhecidas como *Pseudomonas* sp.

*Distribuição dos agentes por faixa etária:* Para *N. meningitidis*, verificamos que 207 casos (74%) situaram-se entre 0 — 20 anos de idade. Na faixa etária compreendida entre 0 — 5 anos, rotineiramente referida como aquela de predileção das meningoencefalites meningocócicas, nossa freqüência de casos foi da ordem de 22%, diversa daquelas descritas por autores como Bryodi (5), para os Estados Unidos (48%) ou Le Viguellaux (18), para a França (60-65%).

Discriminando nossos achados, pelas diversas faixas etárias, verificaremos, entre 0 — 1 ano, valores de 7%; 2 — 5 anos, 16%; 6 — 15 anos, 37%; 16 anos e mais, 39%. (Tabela I)

Dos dados expostos, ressalta a nítida tendência à maior freqüência de casos nas faixas etárias mais elevadas, com acentuado predomínio nos grupos etários acima de 6 anos. Em termos relativos, a maior concentração de casos situa-se na faixa entre 6 e 15 anos. Tais achados são comparáveis aqueles obtidos em São Paulo, por Moraes et al., em 1974 (22).

No entanto, ao confrontarmos as freqüências de casos por faixa etária obtidas por nós com aquelas detectadas em regiões tropicais, como no "cinturão meningítico"

do Saara, verificaremos padrões bem diversos. Assim é que Le Viguellaux <sup>(18)</sup> cita dados obtidos no Alto-Volta, em 1970, em que definem-se valores de 14 — 15% para a faixa de 0 — 1 ano, 25 — 27% para 2 — 4 anos, 41% para 5 — 15 anos e apenas 19% para maiores de 15 anos. Como se vê, embora o predomínio relativo situe-se em grupo similar ao por nós verificado, os valores para os grupos etários mais jovens (0 — 1 ano) e de maior idade (15 anos e mais), são, respectivamente, superiores e inferiores aos nossos.

Quanto a uma possível diferença na distribuição dos grupos sorológicos de meningococo pelas diversas faixas etárias, não nos foi dado observar quaisquer variações significativas.

Para o gênero *Haemophilus*, em 18 casos (82%), foram isolados do grupo entre 0 — 5 anos, ocorrendo achado interessante que consistiu no isolamento do microrganismo do LCR de dois pacientes adultos contando 23 e 58 anos de idade, o que constitui ocorrência para <sup>(11)</sup>.

Entre as enterobactérias, de um total de 15 amostras isoladas, 7 casos (47%) situavam-se na faixa de 0 — 1 ano, e um total de 11 casos (73%) foram obtidos de pacientes até 7 anos de idade. Os 4 casos restantes foram isolados de pacientes com 30, 50, 52 e 83 anos de idade.

Para *Escherichia coli*, 75% dos casos foram obtidos de crianças abaixo de 7 anos de idade, e para o gênero *Proteus*, em 83% dos casos os pacientes contavam entre 1 e 3 meses de idade.

**Caracterização sorológica de meningococos e resistência aos antimicrobianos:** Ao gruparmos sorologicamente as amostras de *N. meningitidis* envolvidas no atual surto epidêmico, pudemos observar, de junho de 1974 a janeiro de 1975, nítida predominância do grupo sorológico A sobre o grupo C, na proporção de 3 a 4:1 (Tabela IV).

Porém, ao levarmos em conta o predomínio, no atual surto, da etiologia meningocócica e o fato de que os meningococos do grupo C correspondem a cerca de 14% dos isolamentos do microrganismos, podemos supor que a maior parte dos casos clínica e laboratorialmente suspeitos de meningoenfalite bacteriana devem ter etiologia meningocócica, o que sugere a ocorrência, para o grupo sorológico C, de curva epidêmica própria.

É também importante ressaltar que aproximadamente 1/5 das amostras de *N. meningitidis* sorologicamente testadas (246) pertencem a categoria de não-grupadas, sendo aí incluídas tanto as cepas não-grupáveis (pelos soros aglutinantes A, B e C) como as auto-aglutináveis, com frequências de, respectivamente, 5% e 17% (Tabela IV).

Naturalmente, seria de esperar-se considerável redução na frequência de cepas não-agrupáveis, caso utilizássemos antisoros para os grupos sorológicos X, Y e Z, principalmente associados a portadores.

Hollis, Wiggins & Schubert <sup>(13)</sup>, testando 299 amostras de meningococos contra os soros A, B e C, verificaram percentual de amostras não-grupáveis da ordem de 12%, bem acima da frequência de 5% obtida por nós. No entanto, é válido lembrar que parte da amostragem testada por aqueles autores provinha de portadores (nasofaringe ou escarro), onde é sabidamente admitida a grande participação dos grupos X, Y e, particularmente, grupo Z.

No que concerne aos testes de avaliação da sensibilidade dos meningococos aos agentes antimicrobianos de uso corrente, quer na quimioprofilaxia quer no tratamento das meningoencefalites, ficou demonstrada completa sensibilidade a maior parte dos antimicrobianos testados. No entanto, cabe assinalar a inadequação do teste de avaliação da sensibilidade às sulfas quando realizado pela técnica de difusão em discos, mesmo quando este é adequadamente controlado (Tabela V).

Ao serem testadas contra sulfadiazina sódica, pelo teste de diluição em agar, as amostras de *N. meningitidis* revelaram alto grau de resistência ao quimioterápico, sendo todas elas resistentes a concentração de 1 µg/ml. e apenas 44% sensíveis a concentrações de 10 µg/ml. (Tabela VI).

Quanto a correlação entre grupo sorológico e de meningococo e resistência à concentração de 10 µg/ml. de sulfadiazina sódica, verificamos marcante resistência exibida pelo grupo C (95%), enquanto o grupo A revelava mais discreto grau de resistência (28). Abbott & Graves <sup>(1)</sup>, pesquisando amostras isoladas entre 1966 e 1971, na Inglaterra e Irlanda, verificaram situação inversa a descrita por nós, com nítido predomínio de resistência no Grupo A, em comparação ao grupo C.

No entanto, no que se refere a alta resistência a sulfadiazina sódica demonstrada pelo grupo C, nossos achados são praticamente idênticos aqueles obtidos por Moraes et al. (22), para amostras isoladas em São Paulo e testadas no Center for Disease Control (CDC), que definiu valores de resistência, para 10 µg/ml. de sulfadiazina sódica, da ordem de 95%.

#### AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Dr. Waldyr Tavares, Diretor do H.E.S.S. e ao Dr. Linandro Dias,

Diretor da Divisão Médica do mesmo hospital, o constante apoio, ao longo de todas as etapas do presente trabalho, sem o qual seria impossível a sua realização.

Também agradecemos a Biolab-Mérieux Ltda., no pessoa dos Srs. Luís Carlos Menezes de Freitas e Jacques Louis Sicart, a oferta de vários dos seus produtos, ao Dr. José Pinheiro, pela confecção e gentil oferecimento dos discos de antimicrobianos e de optoquina e a Farmitália S.A., que nos cedeu a sulfadiazina sódica utilizada nos testes de diluição em agar.

#### SUMMARY

*Data from the pre-epidemic period and from the present epidemic of meningococcal meningoenzephalitis in the Great Rio de Janeiro area are presented. A thousand suspected cases were bacteriologically studied after lumbar spinal puncture at the Hospital Estadual São Sebastião, in Rio de Janeiro.*

*Aiming at a rapid and simple diagnostic procedure to be applied to spinal fluids errors and hazards of some techniques, based on stained microscopic slides and limited choice of culture media, are discussed.*

*Isolation of etiologic agents varied from three per cent in specimens with less than 10 white cells/mm<sup>3</sup> to 72 per cent with fluids containing more than a thousand cells/mm<sup>3</sup>. The distribution of 356 isolated strains corresponded to: Neisseria meningitidis (281); Haemophilus sp. (22); Enterobacteriaceae (15); pneumococci (26); Gram-negative oxidative rods (3); beta hemolytic streptococci (1) and enterococci (1).*

*Serologically the meningococci corresponded to 51 per cent group A, 2 per cent group B and 14 per cent group C strains. The remaining strains were not grouped with the mentioned available diagnostic sera or demonstrated spontaneous agglutination.*

*Very few cases of resistance to antibiotics were found by using the diffusion sensitivity tests with discs of the common antimeningococcal drugs. Sulphadiazine resistance was frequent, however, particularly within the group C meningococcal isolations, when the dilution tests in solid media, according with the Food and Drug Administration (U.S.A.) instructions were employed.*

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBOTT, J. D. & GRAVES, J. F. R. — Serotype and sulphonamide sensitivity of meningococci isolated from 1966 to 1971. *J. Clin. Pathol.*, 25: 528-530, 1972.
2. ALEXANDER, H. E. — The *Haemophilus* group. In Dubos, R.J. (Ed.), *Bacterial and Mycotic infections of man.*, J. B. Lippincott Co., Philadelphia, 1952.
3. ANDERSON, T. G. — Testing of susceptibility to antimicrobial agents and assay of antimicrobial agents in body fluids. In Blair, J. E., Lennette, E. H. & Truant, J. P. (Eds.), *Manual of Clinical microbiology*, American Society Microbiology, Bethesda, 1970.
4. AUSTRIAN, R. — The pneumococci — identification in cultures of blood and body fluids. In Graber, C. D. (Ed.), *Rapid diagnostic methods in medical microbiology.*, Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1970.
5. BRIODY, B. A. — Systemic infections involving the central nervous system.,

- In* Briody, B. A. & Gillis, R. E. (Eds.), Microbiology and infectious diseases. McGraw-Hill Inc., U.S.A., 1974.
6. BRITT, E. M., NEEDHAM, G. M., BALLOWS, A. & TRUANT, J. P. — Processing of specimens and the initiation of primary cultures and smears., *In* Blair, J. E., Lennette, E. H. & Truant, J. P. (Eds.), Manual of clinical microbiology, American Society for Microbiology, Bethesda, 1970.
  7. CARY, S. G. — The *Neisseria*, *In* Graber, C. D. (Ed.), Rapid diagnostic methods in medical microbiology., Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1970.
  8. COHN, H. J., BARTHOLOMEW, J. W. & JENNISON, M. W. — Staining methods., *In* Society of American Bacteriologists, Comittee on Bacteriological Technic, Manual of Microbiological Methods., McGraw-Hill Inc., New York, 1954.
  9. CORBETT, W. P. & CATLIN, B. W. — Galactosidade activity of lactose-positive *Neisseria*. *J. Bacteriol.*, 95: 52-57, 1968.
  10. DUKES, C. D. — The *Haemophilus* and *Bordetella*., *In* Graber, C. D. (Eds.), Rapid diagnostic methods in medical microbiology, Williams & Wilkins, Co., Baltimore, 1970.
  11. EYKYN, S. J., THOMAS, R. D. & PHILLIPS, I. — *Haemophilus influenzae* meningitis in adults. *British Med. J.*, 1: 463-465, 1974.
  12. HERNANDEZ, P. M., VALENZUELA, M. T. & MAYA, L. R. — Meningoencefalitis bacterianas. *Rev. lat-amer. Microbiol.*, 15: 159-164, 1973.
  13. HOLLIS, D. G. WIGGINS, G. L. & SCHUBERT, J. H. — Serological studies of ungroupable *Neisseria meningitidis*. *J. Bacteriol.*, 95: 1-4, 1968.
  14. HOLLIS, D. G., WIGGINS, G. L. & WEAVER, R. E. — *Neisseria lactamica* sp. n., a lactose-fermenting species resembling *Neisseria meningitidis*. *Appl. Microbiol.*, 17: 71-77, 1969.
  15. JAMES-HOLMQUEST, A. N., WENDE, R. D., MUDD, R. L. & WILLIAMS, R. P. — Comparison of atmospheric conditions for culture of clinical specimens of *Neisseria gonorrhoeae*. *Appl. Microbiol.*, 26: 466-469, 1973.
  16. KELLOGG JR., D. S., PEACOCK JR., W. L., DEACON, W. E., BROWN, L. & PIRKLE, C. I. — *Neisseria gonorrhoeae*. I. Virulence genetically linked to clonal variation. *J. Bacteriol.*, 85: 1274-1279, 1963.
  17. KING, E. O. The identification of unusual pathogenic gram negative bacteria. Center for Disease Control, Atlanta, 1974.
  18. LE VIGUELLAUX, J. — La méningite cérébro-spinale á méningocoques. Epidemiologie et problemes prophylactiques. *Med. Trop.*, 34: 405-419, 1974.
  19. McCARTY, M. — The *Neisseriae*., *In* Davis, B. D., Dulbecco, R., Eisen, H. N., Ginsberg, H. S. & Wood, W. B. (Eds.), Microbiology., Harper & Row Inc., U.S.A., 1973.
  20. McCARTY, M. — Host-parasite relations in bacterial infections., *In* Davis, B. D., Dulbecco, R., Eisen, H. N., Ginsberg, H. S. & Wood, W. B. (Eds.), Microbiology., Harper & Row Inc., U.S.A., 1973.
  21. MINISTÉRIO DA SAÚDE, FUNDAÇÃO SESP — Doença meningocócica no Estado da Guanabara. *Boletim Epidemiológico*, 6: 171, 1974.
  22. MORRAIS, J. S., MUNFORD, R. S., RISI, J. B., ANTEZANA, E. & FELDMAN, R. A. — Epidemic disease due to serogroup C *Neisseria meningitidis* in São Paulo, Brazil., *J. Infect. Dis.*, 129: 568-571, 1974.
  23. SOLE-VERNIN, C. — Estudos sobre os estreptococos. *An. Microbiol.*, 4: 11-20, 1956.
  24. SUASSUNA, I. & SUASSUNA, I. R. — Enterobactérias: Diferenciação bioquímica. *Rev. Bras. Patol. Clin.*, 1: 8-18, 1969.
  25. SUASSUNA, I., LOURENÇO, N. J., ANDRADE, J. R. C. & PEREIRA, A. A. — *Neisseria lactamica* em portadores. Causa de erro no diagnóstico de meningococos. *Rev. Bras. Patol. Clin.*, 11: 32, 1975.
  26. THAYER, J. D., DEACON, W. E. & GARSON, W. — Gonococcus — procedures for isolation and identification., Center for Disease Control, Atlanta, 1963.
  27. YOUNG, V. M. — *Haemophilus*., *In* Blair, J. E., Lennette, E. H. & Truant, J. P. (Eds.), Manual of clinical microbiology, American Society for Microbiology, Bethesda, 1970.