

ISOLAMENTO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO *

Chifumi TAKEUCHI **
Gil Vital Álvares PESSÔA **
Ernesto HOFER ***
Carmo Elias Andrade MELLES **
Mathilde RASKIN **

RIAL-A/405

TAKEUCHI, C.; PESSÔA, G.V.A.; HOFER, E.; MELLES, C.E.A. & RASKIN, M. — Isolamento de *Listeria monocytogenes* de líquido cefalorraquidiano. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 101-107, 1974.

RESUMO: Foi realizada pesquisa sistemática em 1 008 amostras de líquidos cefalorraquidianos, turvos e purulentos, no período de novembro de 1973 a junho de 1974, no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil, que demonstraram ausência de outros microrganismos, no intuito de esclarecer a participação de *Listeria monocytogenes*. Todas as amostras foram incubadas nas temperaturas de 4 e 15°C, tendo sido isolada esta bactéria em 4 amostras; em uma delas, apenas a 4°C, em duas, apenas a 15°C e, em uma, em ambas as temperaturas. A quase totalidade, foi isolada após uma semana de incubação a baixa temperatura.

Três amostras pertenciam ao sorotipo L 1/2a e uma ao L 4/b.

DESCRITORES: meningite por *Listeria*; *Listeria monocytogenes*; líquido cefalorraquidiano, isolamento de *Listeria monocytogenes*.

I N T R O D U Ç Ã O

A despeito das inúmeras descrições revelando o crescente aumento da freqüência do encontro de *Listeria monocytogenes* na natureza ^{3, 17}, ainda assim, o seu isolamento de espécimes clínicos, contaminados

ou não, apresenta sérias dificuldades devidas principalmente à peculiaridade inerente ao seu primo isolamento.

Contornada essa situação, o microrganismo desenvolve-se com extrema facilidade nos meios artificiais comumente empregados, à temperatura de 37°C.

* Realizado na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, S.P., e no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, GB.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

*** Do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto Oswaldo Cruz.

A técnica de crio-enriquecimento em temperaturas de 4°C é considerada de fundamental importância no isolamento dessa bactéria, segundo vários autores^{1,3,4,5,8,10,11,13,17}, embora DESPIERRES⁴ tenha utilizado e preconizado a temperatura de 15°C, como ideal para o enriquecimento de *Listeria*, em material altamente contaminado.

Com o intuito de esclarecer a participação deste microrganismo na etiologia das meningites purulentas, foi realizada na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, durante o período de novembro de 1973 a junho de 1974, uma pesquisa sistemática em líquidos cefalorraquidianos (L.C.R.) oriundos de doentes internados no Hospital Emílio Ribas, São Paulo, nos quais os resultados demonstraram ausência de outros agentes bacterianos, normalmente detectados pelo esquema rotineiro adotado por esta Seção.

Considerando a importância do crio-enriquecimento para o cultivo inicial de *L. monocytogenes*, foi ainda efetivada, no transcurso deste levantamento, uma análise confrontando o comportamento das temperaturas de 4°C e 15°C, durante a fase do isolamento primário.

MATERIAL E MÉTODO

Foram examinadas 1.008 amostras de L.C.R., caracteristicamente turvos ou purulentos, provenientes de doentes internados

no Hospital Emílio Ribas. A totalidade deste material não evidenciou crescimento microbiano nos meios de cultura, utilizados na rotina, para demonstrar a presença de outras bactérias.

Alíquotas de 0,5 ml de L.C.R. foram semeadas em duplicata, em tubos contendo 10 ml de caldo triptose*, com 0,5% de dextrose, sendo uma das amostras incubada a 4°C e outra a 15°C, durante cinco semanas. Dos meios semeados, foram retirados repiques semanalmente e transferidos para placas de ágar triptose* e incubados a 37°C, por 48 horas.

Para o reconhecimento e isolamento das colônias lançou-se mão da técnica de GRAY⁷, sendo a seguir analisadas sob o ponto de vista morfo-tintorial e bioquímico.

Nas linhagens que se comportaram como *Listeria monocytogenes*, fez-se a caracterização sorológica, de acordo com o processo descrito por DONKER-VOET⁵, aliada à execução da prova de Anton, que evidencia a ação patogênica experimental desta bactéria.

RESULTADOS

Das 1.008 amostras de L.C.R. estudadas foram isoladas e identificadas 4 cepas de *Listeria monocytogenes*, que apresentaram os seguintes caracteres morfológicos, culturais, bioquímicos e poder patogênico experimental, sumariados na tabela 1:

* Tryptose Broth Difco.

** Tryptose ágar Difco.

TABELA 1

Caracteres morfológico, cultural, bioquímico e patogenicidade experimental das 4 cepas de Listeria monocytogenes isoladas

Gram	positiva
Flagelação (campo escuro)	peritriquia
Metabolismo respiratório	aeróbio, anaeróbio facultativo
Crescimento em ágar nutriente	colônias pequenas com bordos lisos
Hemólise em ágar sangue de carneiro	total (beta)
Motilidade a 37°C	negativa
a 22°C	positiva
Catalase	+
Oxidase	-
Nitrato redutase	-
Urease	--
H ₂ S	--
Arabinose	-
Dextrina	+
Esculina	+
Glicose	+ (sem gás)
Lactose	+ (1)
ONPG	+
Levulose	+
Maltose	+
Manitol	-
Ramnose	+ (2)
Sacarose	+ (3)
Salicina	+
Trealose	+
Prova de Anton	positiva

+ = ácido após 1 dia.

- = negativo após 30 dias.

(1) = 2 amostras positivas em 5 dias, 2 amostras positivas em 10 dias.

(2) = 1 amostra positiva em 3 dias.

(3) = 1 amostra positiva em 3 dias, 3 amostras positivas em 10 dias.

A identificação sorológica efetuada revelou a presença de dois sorotipos distintos (tabela 2):

As amostras identificadas nesta etapa de trabalho, como prováveis pertencentes

ao sorotipo L 1/2a (culturas números 121, 199 e 352), foram, em fase subsequente, analisadas diante dos anti-soros OH dos tipos L 1/2a e L 1/2b. Os resultados, obtidos na titulação dos antígenos flagelares,

TABELA 2

Caracterização sorológica das amostras isoladas de Listeria monocytogenes

Antígenos somáticos	Antígenos somáticos			
	L 1/2a	L 1/b	L 4a	L 4b
L 1/2a	1/640	1/320	—	—
L 1/2b	1/320	1/1 280	1/20	1/20
L 4a	1/20	1/20	1/1 280	1/160
L 4b	1/40	1/20	1/80	1/1 280
121	1/640	1/160	1/20	1/20
199	1/640	1/320	—	1/20
352	1/640	1/320	1/40	1/20
826	—	—	1/80	1/1 280

TABELA 3

Distribuição dos sorotipos isolados segundo a idade e o sexo

Número das amostras	Sorotipos	Idade (anos)	Sexo
121	L 1/2a	57	Fem.
199	L 1/2a	1	Fem.
352	L 1/2a	39	Masc.
826	L 4b	12	Fem.

demonstraram que as cepas em questão enquadram-se com uniformidade no sorotipo L 1/2a.

Com referência a outros aspectos implicados com o isolamento dos diferentes

sorotipos de *Listeria monocytogenes*, cumpre ainda destacar os dados referentes à idade e sexo dos portadores (tabela 3), assim como os períodos em que foram detectados após o enriquecimento nas duas temperaturas empregadas (tabela 4):

TABELA 4

Freqüência dos isolamentos das amostras nos diferentes períodos de crio-enriquecimento e nas temperaturas empregadas

Número das amostras	Soro-tipos	Presença de crescimento em semanas					Temperaturas	
		1. ^a	2. ^a	3. ^a	4. ^a	5. ^a	4°C	15°C
121	L 1/2a	+	+	+	+	+	+	-
199	L 1/2a	+	+	-	-	+	-	+
352	L 1/2a	+	+	-	-	+	-	+
826	L 4b	-	+	+	+	-	+	+

+ = positiva
- = negativa

DISCUSSÃO

As manifestações clínicas da listeriose humana são extremamete variáveis, observando-se, no entanto, predominância de localização no sistema nervoso central e, neste, comprometimento preferencial das meninges, de acordo com BUSCH³ e SEELIGER¹⁵.

A *Listeria monocytogenes* pode advir como agente secundário de diversas afecções de natureza crônica, como soe acontecer no transcurso da Doença de Hodgkin, de outras neoplasias, no diabetes mélico e no lupus eritematoso. Por vezes, esta situação está intimamente relacionada com o emprego de certos esquemas terapêuticos, em que se faz uso de corticóides e de fármaco-imuno-depressores (GRABER et alii⁶, BUCHNER & SCHNEIERSON² e JOHNSON & COLLEY¹²).

Um exemplo bem típico do problema questionado refere-se ao achado de SUASSUNA et alii¹⁶, que isolaram uma amostra de *Listeria monocytogenes*, caracterizada como sorotipo L 1, de um caso de meningite em paciente adulto e cujo diagnóstico primário foi firmado como sendo linfoma.

Nos quatro casos em que foi isolada *Listeria*, o quadro clínico era o de meningite purulenta aguda, não tendo em nenhum deles ocorrido a administração de drogas imunodepressoras; todos os pacientes alcançaram a cura clínica.

Embora seja restrito o número de nossas observações, é interessante assinalar que as amostras 352 e 826 foram isoladas de pacientes pertencentes às faixas etárias em que raramente é assinalada a presença de *Listeria* como causa de meningite ou meningoencefalite (BOJSEN-MÖLLER¹).

Outro aspecto a ser detalhado é o da importância do crio-enriquecimento como técnica prioritária para o isolamento dessa bactéria, considerando que, na maioria das vezes, a incubação do material a 37°C é satisfatória para o seu pleno desenvolvimento. Sem dúvida alguma, esta condição cria sérios problemas para a adoção mais imediata das medidas terapêuticas, tendo em vista a demora do diagnóstico bacteriológico; todavia, nenhum outro recurso laboratorial foi idealizado para contornar este óbice, até o momento.

Verifica-se, pelos resultados expostos na tabela 4, na incubação do material a baixa temperatura, que a quase totalidade das amostras de *Listeria* foi isolada após uma semana de permanência e, curiosamente, todas as amostras pertenciam ao sorotipo L 1/2; cumpre também salientar que a temperatura de 15°C evidenciou uma pequena superioridade sobre a de 4°C, no que tange ao crescimento das amostras isoladas. Este aspecto, por sinal, é dos mais controvertidos, tendo em vista as diferentes opiniões emitidas, nas quais se encontram referências à temperatura ideal para *Listeria*

monocytogenes, situada a 4°C, segundo GRAY & KILINGER⁸, GRAY & STAFSET⁹ e BOJSEN-MÖLLER¹; 10°C, segundo WILKINS et alii¹⁸; 15°C, segundo DESPIERRES⁴; 30°C, segundo KRAMER & JONES¹⁴.

CONCLUSÕES

Pela primeira vez em São Paulo foi conseguido o isolamento e a identificação

de *Listeria monocytogenes* entre 1 008 L.C.R. turvos ou purulentos, provenientes do Hospital Emílio Ribas. Dos quatro casos, três pertenciam ao sorotipo L 1/2a e um ao L 4b.

Todos os pacientes apresentaram um quadro clínico agudo de meningite purulenta, tendo alcançado a cura.

Se bem que a casuística seja pequena, o melhor resultado por nós obtido foi com enriquecimento à temperatura de 15°C.

RIAL-A/405

TAKEUCHI, C.; PESSOA, G.V.A.; HOFER, E.; MELLES, C.E.A. & RASKIN, M. — Isolation of *Listeria monocytogenes* from cerebrospinal fluid. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 101-107, 1974.

SUMMARY: From November 1973 to June 1974 a systematic research on 1 008 samples of feculent and purulent cerebral spinal fluid was carried out at the Instituto Adolfo Lutz. Such study was developed to disclose the extension of the role of *Listeria Monocytogenes* in this type of infection. As a general result it was demonstrated that no other micro-organisms took part in the process. All samples were incubated from 4 samples only. In one of these samples isolation was made at 4°C; in two other samples at 15°C and in the 4th sample isolation was obtained at both temperatures.

In almost all cases bacteria was isolated after one week incubation period under low temperature.

DESCRITORES: meningitis, *Listeria*; *Listeria monocytogenes*; cerebrospinal fluid, isolation of *Listeria monocytogenes*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOJSEN-MÖLLER, J. — Human Listeriosis: diagnostic, epidemiological and clinic studies. *Acta path microbiol. scand.*, Section B (Suppl.), 229: 1-157, 1972.
2. BUCHNER, L.H. & SCHNEIERSON, S.S. — Clinical and laboratory aspects of *Listeria monocytogenes* infections, with a report of ten cases. *Am. J. Med.*, 45: 904-21, 1968.
3. BUCH, A.L. — Human Listeriosis in the United States, 1967-1969. *J. infect. Dis.*, 123: 328-32, 1971.
4. DESPIERRES, M. — Isolement de *Listeria monocytogenes* dans un milieu défavorable a *Streptococcus faecalis*. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*, 121: 493-501, 1971.
5. DONKER-VOET, J. — A serological study of some strains of *Listeria monocytogenes* isolated in Michigan. *Am. J. vet. Res.*, 20: 176-9, 1959.
6. GRABER, C.D.; HIGGINS, L.S. & DAVIS, J.S. — Seldom-encountered agents of bacterial meningitis. *J. Am. med. Ass.*, 192: 956-60, 1965.

TAKEUCHI, C.; PESSÔA, G.V.A.; HOFER, E.; MELLES, C.E.A. & RASKIN, M. — Isolamento de *Listeria monocytogenes* de líquido cefalorraquidiano. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **34**: 101-107, 1974.

7. GRAY, M.L. — A rapid method for the detection of colonies of *Listeria monocytogenes*. *Zentbl. Bakt. Parasitkde, Abt. I, Orig.*, **169**: 373-77, 1957.
8. GRAY, M.I. & KILLINGER, H.A. — *Listeria monocytogenes* and Listeric infection. *Bact. Rev.*, **30**: 309-82, 1966.
9. GRAY, M.L.; STAFSETH, H.J., THORP JR., F.; SHOLL, L.B. & RILEY JR., W.P. — A new technique for isolating *Listerellae* from bovine brain. *J. Bact.*, **55**: 471-6, 1948.
10. HOFER, E. — Presença de *Listeria monocytogenes* em material encefálico do bovino. *Arq. Inst. Biol. (S. Paulo)*, **38**: 285-7, 1971.
11. HOFER, E. — Studies on a strain of *Listeria (L. grayi)* isolated from bovine nasal secretion. *Rev. Microbiol.*, **3**: 101-2, 1972.
12. JOHNSON, M.L. & COLLEY, E.W. — *Listeria monocytogenes* encephalitis associated with corticosteroid therapy. *J. clin. Path.*, **22**: 465-9, 1969.
13. KAMPELMACHER, E.H. & JANSEN, M.V. M. — Further studies on the isolation of *L. monocytogenes* in clinically healthy individuals. *Zentbl. Bakt. Parasitkde, Abt. I, Orig, Ser. A*, **221**: 70-77, 1972.
14. KRAMER, P.A. & JONES, D. — Media selective for *Listeria monocytogenes*. *J. appl. Bact.*, **32**: 381-94, 1969.
15. SEELIGER, H.P.R. — *Listeriosis*. New York, Hafner, 1961. 308 p.
16. SUASSUNA, I.; SANTOS, L.C.; SUASSUNA, I.R. & PINHEIRO, J. — Listeriose do Sistema Nervoso no Estado da Guanabara. *Anais Microbiol.*, **16**: 161, 1969.
17. WELSHIMER, H.J. & DONKER-VOET, J. — *Listeria monocytogenes* in nature. *Appl. Microbiol.*, **21**: 516-9, 1971.
18. WILKINS, P.O.; BOURGEOIS, R. & MURRAY, R.G.E. — Psychotropic properties of *Listeria monocytogenes*. *Can. J. Microbiol.*, **18**: 543-51, 1971.

Recebido para publicação em 18 de setembro de 1974.

