

ISOLAMENTO DE *CLOSTRIDIUM TETANI* DO CÔTO UMBILICAL E DE MATERIAL ONFALECTOMIZADO PROCEDENTE DE RECÉM-NASCIDOS COM TÉTANO

JOSÉ ANTONIO SERRANO *

A etiologia do tétano do recém-nascido continua assunto controvertido, havendo autores que aceitam a teoria clostrídica, outros que a negam e outros, ainda, que mantêm uma atitude eclética (ver discussão e bibliografia em Pinheiro ⁹).

A revisão da literatura brasileira esclarece que o bacilo tetânico nunca foi encontrado ao exame microscópico e através de cultivo da ferida umbilical. Bahia ¹, em material colhido pela raspagem profunda da ferida umbilical, reproduziu a toxiinfecção tetânica. Entretanto, o autor não emprestou maior importância ao fato, tanto assim que, de intransigente defensor da etiologia clostrídica, passou não só a aceitar a "síndrome tetânica neonatal", como a duvidar do valor das provas de laboratório no diagnóstico do tétano do recém-nascido.

Alguns autores procuraram explicar a negatividade das pesquisas do bacilo, admitindo a possibilidade da localização do mesmo no coto umbilical mumificado, possibilidade esta que só recentemente foi demonstrada por Pinheiro ⁸, através da inoculação de triturados em camundongos.

Matos e col. ⁶, em 1951, tentando reproduzir experimentalmente o quadro do tétano umbilical, contaminou o umbigo de cobaias recém-nascidos com culturas de diversos germes, estafilococo hemolítico, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus morgannii*, *Escherichia coli* e *Clostridium tetani*, conseguindo apenas com este último provocar a doença.

A controvérsia suscitada entre os estudiosos brasileiros a respeito da etiologia clostrídica do tétano do recém-nascido foi motivada, não só pela negatividade das pesquisas laboratoriais, como também pelo insucesso do soro antitetânico e pelos bons resultados obtidos, em alguns casos, com o tratamento pela penicilina.

A repercussão dos trabalhos brasileiros levou autores sul-americanos a se interessarem pelo assunto, constatando sempre absoluta negatividade quanto ao isolamento, na ferida umbilical, do bacilo tetânico. Impressionados com este fato, eles passaram a adotar o ponto de vista dos colegas brasileiros, que responsabilizam os germes de supuração e não o *Clostridium tetani* como o agente etiológico (ver discussão e bibliografia em Pinheiro ⁹).

* Monitor do Departamento de Microbiologia e Imunologia (Prof. Carlos da Silva Lacaz) e acadêmico do quarto ano da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A revisão da literatura norte-americana e européia evidencia a mesma controvérsia, apesar da descoberta do bacilo tetânico por Nicolaier datar de 1884. Somente em número muito reduzido de casos o bacilo tetânico foi encontrado na ferida umbilical, até a presente data. Beumer², Kitasato⁵ e Peiper⁷, entre outros autores, conseguiram demonstrar a presença do *Clostridium tetani* em material colhido de recém-nascidos com tétano umbilical, concluindo, após pesquisas cuidadosas, que tanto o tétano do adulto como o do recém-nascido reconheciam a mesma etiologia clostrídica. Afirmaram, todavia, ser grande a dificuldade do cultivo e isolamento do *Clostridium tetani*. A casuística dos resultados negativos é muito mais numerosa e apresenta, por esta razão, significado estatístico mais importante. Este fato levou também certo grupo de autores europeus a aceitar a responsabilidade de outros agentes que não o *Clostridium tetani*. Em virtude da melhoria do padrão econômico-social das populações européias e norte-americanas, observou-se, concomitantemente, redução e praticamente desaparecimento da moléstia nestes países, aumentando o desinterêsse pelo problema. O mesmo, porém, não acontecia nos países subdesenvolvidos, como o Brasil, onde o tétano do recém-nascido representa grave problema de saúde pública.

Convém referir que, no momento atual, as técnicas para isolamento e identificação dos germes anaeróbios sofreram grandê desenvolvimento, permitindo estudo mais acurado de tais microrganismos.

A IV Jornada Brasileira de Puericultura e Pediatria recomendou a experimentação para resolver o problema da etiologia do tétano do recém-nascido. Foi o que procuramos fazer.

MATERIAL E MÉTODOS

O material estudado consistiu em 20 amostras de coto umbilical mumificado (sendo 4 de recém-nascidos normais) e 13 umbigos ressecados post mortem, obtidos de casos de tétano do recém-nascido, procedentes do Serviço de Pediatria do Hospital das Clínicas.

O referido material, depois da trituração em geral, foi colocado em tubos contendo 5 ml de solução fisiológica. Após suspensão do triturado, foram feitos esfregaços corados pelo método de Gram. Parte da referida suspensão foi inoculada em 4 camundongos por via subcutânea, na dose de 0,2 ml para cada animal. Dêstes, 2 estavam protegidos com sôro antitetânico (600 UI em volume de 0,2 ml).

O restante do material foi aquecido a 50°C durante meia hora para a sementeira. Os meios utilizados foram: Tarozzi, Bonnel⁴, Brewer (tioglicolato), ágar-sangue e ágar-sangue de Zeissler. Este último meio foi incubado em jarra de anaerobiose, a 37°C. Quanto ao ágar-sangue, o método utilizado foi o de Fortner, modificado por Jacobsthal (cit. por Bier³). A anaerobiose biológica se fez com o cultivo da *Serratia marcescens*. Os meios foram semeados e incubados a 37°C, sendo observados em períodos de 24, 48, 72 horas e 1 semana. O crescimento nos tubos e placas foi anotado, praticando-se, igualmente, coloração pelo método de Gram.

Desenvolvida uma bactéria anaeróbia esporulada, geralmente a partir do meio de Bonnel, inoculávamos camundongos (4 por experiência, sendo 2 protegidos com o sôro antitetânico). A quantidade inoculada nestes animais foi de 0,25 ml do meio, por via subcutânea. Seis culturas, em Bonnel, foram inoculadas em cobaios, também por via subcutânea, num volume de 0,50 ml. Em cada experiência empregávamos um animal protegido com sôro antitetânico (1.500 UI, em volume de 0,5 ml).

O material cultivado com o triturado aquecido a 80°C durante 30 minutos, deixado em temperatura ambiente, favorecia a esporulação e a formação de cápsula. Devido a este fato, fazíamos, periodicamente, esfregaços corados pelos métodos de Dorner e de Wirtz para esporos, e de Möller, modificado por Mello (comunicação pessoal) para cápsula (fig. 1).

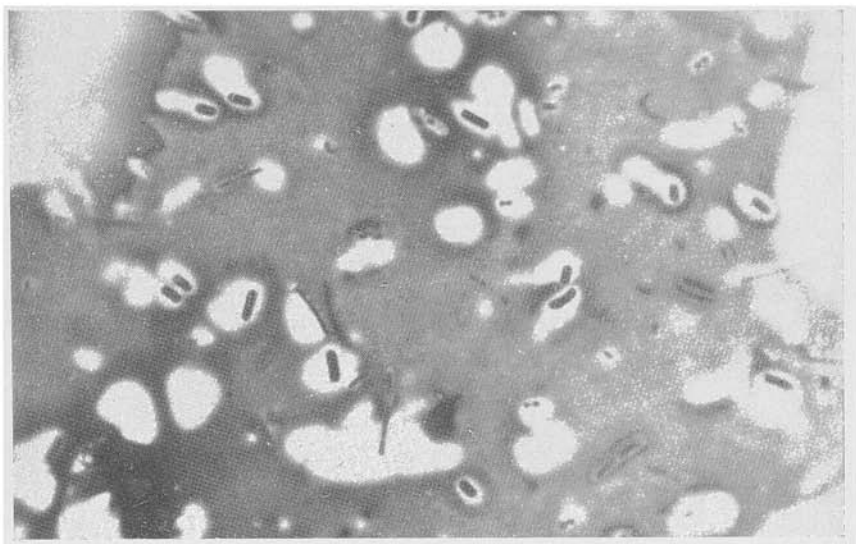


Fig. 1 — *Clostridium perfringens*. Evidenciação de cápsula em amostra de leite com "fermentação tempestuosa". Coloração pelo Möller, modificado por Mello ($\times 900$).

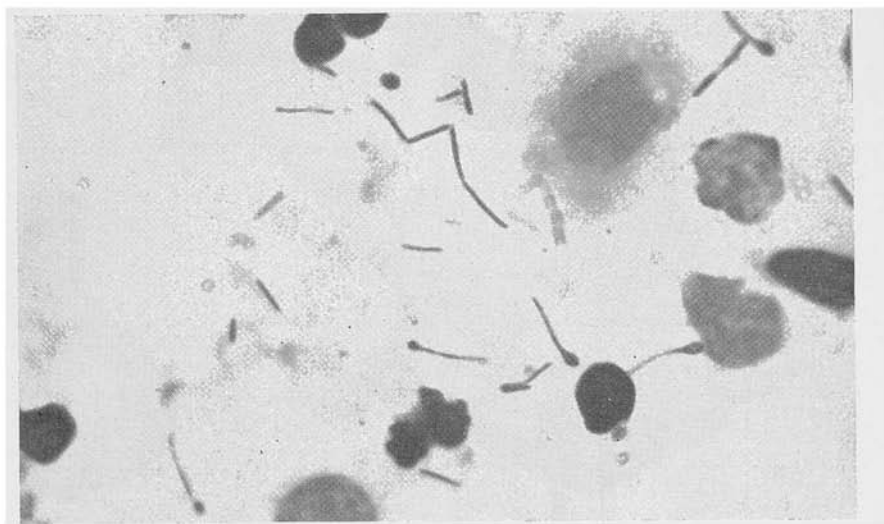


Fig. 2 — Aspecto microscópico de material por punção cardíaca, de cobaia inoculado com cultura mista de *Clostridium perfringens* e *Clostridium tetani*. Coloração pelo Gram ($\times 900$).

Treze culturas, a partir do meio de Bonnel, foram passadas para leite, a fim de se verificar a «fermentação tempestuosa», de Hall. A partir do material colhido do leite, efetuamos a prova de Welch e Nuttall em 9 cobaios, injetando 0,2 ml do meio, por via intracardiaca (fig. 2). Em 6 casos, a partir do material colhido dos cobaios (sangue e fígado), fizemos cultivo em Bonnel, seguindo-se a prova de Neagle (ágar-ôvo).

Em 3 casos foi praticada a dosagem in vivo da toxina tetânica desenvolvida após cultivo em meio de Bonnel, bem como em caldo de carne com pepsina (meio utilizado no Instituto Pinheiros). Pelo processo do esgotamento em ágar-sangue (método de Fortner), após repicagem para o meio de Bonnel, conseguimos obter, em 4 casos, amostras puras de *Clostridium tetani*, as quais foram estudadas parcialmente do ponto de vista bioquímico (tabela 3).

RESULTADOS

Os resultados obtidos estão condensados nas tabelas 1, 2 e 3.

Os esfregaços corados pelo método de Gram, preparados a partir do triturado do coto umbilical ou do umbigo ressecado, revelaram a presença de cocos abundantes, bacilos Gram positivos e algumas formas bacilares Gram negativas. Não conseguimos evidenciar, pela bacterioscopia, formas esporuladas morfológicamente semelhantes ao *Clostridium tetani*.

Tabela 1 — RESULTADO DA PESQUISA DE GERMES ANAERÓBIOS E DA IDENTIFICAÇÃO DO *CLOSTRIDIUM TETANI* EM MATERIAL DE COTO UMBILICAL MUMIFICADO E DE UMBIGO RESSECADO POST MORTEM EM PACIENTES TETÂNICOS E NORMAIS

Casos	Material semeado	Número de amostras	Resultados positivos do cultivo para anaeróbios					Prova para caracterização do <i>Clostridium tetani</i> *	
			Tarozzi	Bonnel	Ágar-sangue	Ágar-sangue Zeissler *	Brewer *	Inoculação do triturado	Inoculação da cultura
Tetânicos	Coto umbilical mumificado	16	14	14	14	12	7	8	14
	Umbigo	13	3	3	2	—	—	—	3
Normais (testemunhos)	Coto umbilical mumificado	4	—	—	—	—	—	—	—
Total		33	17	17	16	12	7	8	17

* No meio de Zeissler foram semeadas apenas 14 amostras e no Brewer 8, dentre as que haviam sido positivas nos demais meios.

Tabela 2 — RESULTADO DAS PROVAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* EM MATERIAL DE COTO UMBILICAL MUMIFICADO E UMBIGOS RESSECADOS POST MORTEM DE RECÉM-NASCIDOS TETANICOS

Provas	Coto umbilical mumificado		Umbigo	
	N.º de casos	N.º de positivos	N.º de casos	N.º de positivos
Prova do leite	10	9	3	—
Prova de Welch e Nuttal ..	7	6	2	—
Prova de Neagle	6	6

Tabela 3 — RESULTADOS DAS PROVAS BIOLÓGICAS E DA DOSAGEM DE TOXINA DE CULTURAS PURAS DE *CLOSTRIDIUM TETANI* OBTIDAS DE 4 CASOS DE RECÉM-NASCIDOS TETANICOS, ISOLADAS DO COTO UMBILICAL MUMIFICADO

Amostra número	Provas biológicas								Dosagem da toxina (DMM)
	Motilidade	Dextrose	Lactose	Manita	Indol	Liquificação da gelatina	H ₂ S	Digestão do leite	
1	+	—	—	—	+	±	+	—	1/5
2	+	—	—	—	+	±	+	—	1/170
3	+	—	—	—	+	+	+	—	1/2000
4	+	—	—	—	+	+	—	—	...

Em meios de Tarozzi (33 casos), Bonnel (33 casos) e Brewer (8 casos), 24 horas após já se notava menor incidência das formas em coco, predominando bastonetes grossos e curtos, Gram positivos, ao lado de bacilos finos e compridos, Gram positivos em sua maioria. O exame bacterioscópico de algumas culturas, após 48 horas de incubação, revelou bastonetes de extremidades arredondadas, Gram positivos, ao lado de formas filamentosas Gram negativas e bacilos esporulados (esporo terminal), com aspecto semelhante ao de "alfinê de cabeça" (fig. 3). Também estavam presentes bastonetes esporulados, em cadeia, com esporo central ou subterminal, Gram positivos,

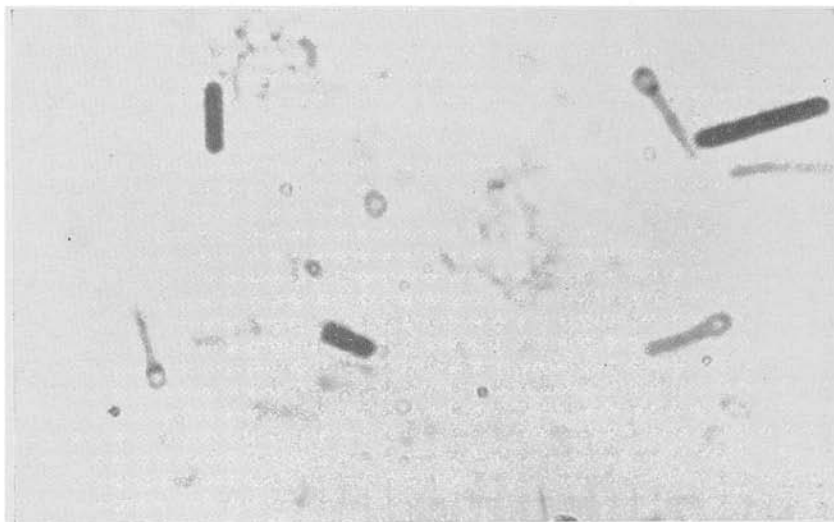


Fig. 3 — Cultura em meio de Bonnel, de material de coto umbilical mumificado, de recém-nascido com tétano. Notar formas esporuladas semelhantes a *Clostridium tetani* e formas vegetativas de *Clostridium perfringens*. Coloração pelo Gram ($\times 900$).

muito semelhantes a *Bacillus subtilis*. Formas bacilares Gram positivas, capsuladas, arredondadas em um extremo e cortadas a pique no outro, foram de observação freqüente, sugerindo tratar-se de *Clostridium perfringens*.

Após 72 horas encontramos a mesma flora, mas em algumas culturas aumentou a incidência das formas bacilares esporuladas, com esporo terminal.

Nos meios líquidos e no misto, após 24 horas, a turvação foi constante, sendo que, em algumas culturas, se formava verdadeiro “depósito” no fundo, podendo-se notar aspectos de “flocos de algodão”, amarelados, principalmente quando os meios eram deixados à temperatura ambiente, durante sete dias aproximadamente.

Em ágar-sangue (32 casos) e em ágar-sangue de Zeissler (15 casos), após 48 horas, notou-se crescimento abundante, espalhado, mais condensado no centro. Em algumas placas, bem como nos tubos, ao serem abertos, sentia-se cheiro de “chifre queimado”, misturado a um odor butírico-sulfúrico. A coloração pelo método de Gram, de diversos pontos das placas, mostrava flora idêntica à verificada nos meios líquidos, diminuindo, porém, a presença do *Bacillus subtilis*, principalmente em placas semeadas de acôrdo com o método de Fortner.

As culturas em meios líquidos e no misto, deixadas à temperatura ambiente, e examinadas periódicamente, mostraram sempre aumento das formas bacilares esporuladas. Os resultados do cultivo para germes anaeróbios, sem levar em consideração o seu estado de pureza, encontram-se na tabela 1.

A inoculação em camundongos, das culturas obtidas em meio de Bonnel (quadro I), permitiu reproduzir o tétano 17 vezes (fig. 4), em um período

de tempo variável entre 24 horas e 7 dias. Apenas em uma ocasião, os 2 camundongos "protegidos" pelo soro antitetânico apresentaram o quadro da toxiinfecção. Como alguns camundongos mostravam necrose no ponto de inoculação, injetamos 6 culturas, a partir do meio de Bonnel, em cobaios

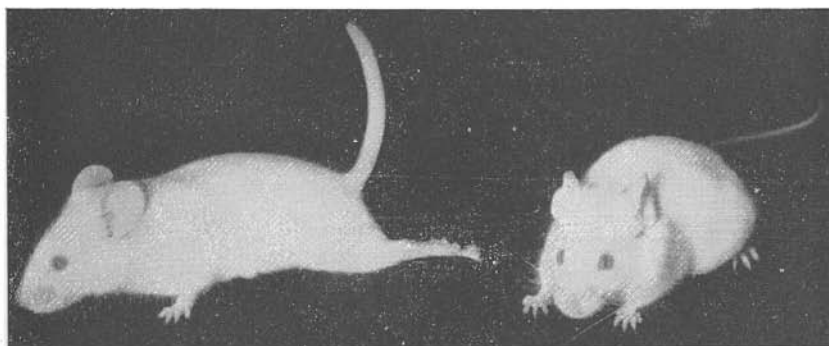


Fig. 4 — Camundongo com tétano experimental à esquerda. À direita, camundongo protegido com soro antitetânico. Material inoculado: cultura em meio de Bonnel, obtida a partir de coto umbilical mumificado, de recém-nascido com tétano.

(fig. 5), por via subcutânea (0,5 ml). Nestes animais, independentemente da produção de quadro tetânico, verificamos edema do tecido celular subcutâneo, no ponto de inoculação, que se estendia por tódã a pata do lado inoculado, tomando com o tempo aspecto cianótico, seguida de necrose.

A bacterioscopia da secreção cutânea revelou formas bacilares Gram positivas, capsuladas, semelhantes ao *Clostridium perfringens*, ao lado de bacilos esporulados com a morfologia do *Clostridium tetani*. Suspeitando

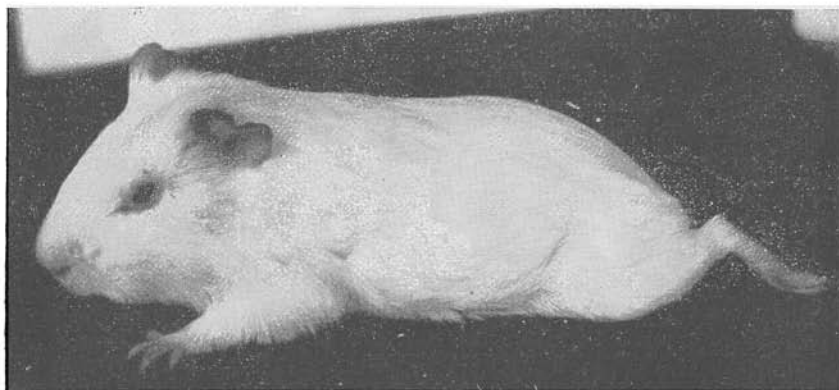


Fig. 5 — Tétano experimental em cobaio. Material inoculado: cultura em meio de Bonnel, de material procedente de coto umbilical mumificado, de paciente com tétano do recém-nascido.

que o material em prova contivesse *Clostridium perfringens*, ao lado do *Clostridium tetani*, passamos a pesquisar o primeiro microrganismo, através do cultivo em meio de Bonnel (13 cultivos), utilizando as provas do leite, de Welch e Nuttal (fig. 6) e de Neagle (tabela 2).

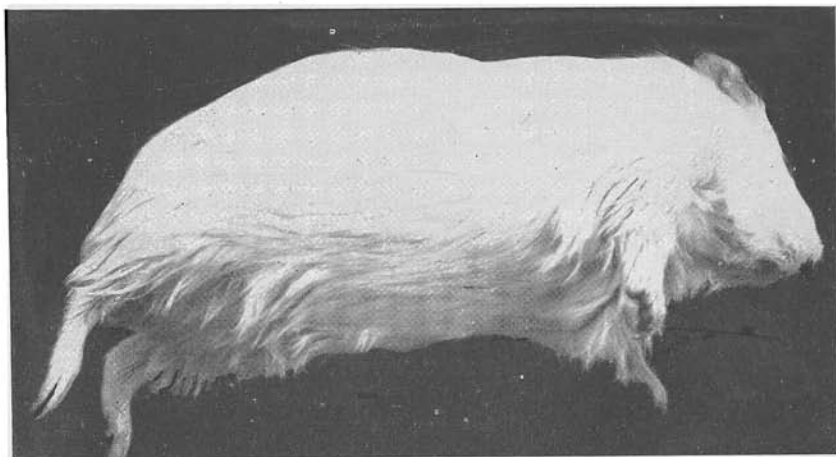


Fig. 6 — Prova de Welch e Nuttal positiva em cobaio inoculado com cultura mista de *Clostridium perfringens* e *Clostridium tetani*.

COMENTÁRIOS

O trabalho por nós efetuado demonstra, de modo inequívoco, que é possível o isolamento do *Clostridium tetani*, principalmente, do coto umbilical do recém-nascido com tétano. Assim, de 16 amostras de coto umbilical mumificado de recém-nascidos com tétano, isolamos em 14 casos (87,5%) o *Clostridium tetani*, que quase sempre está associado, no material em aprêço, a outros germes, inclusive o *Clostridium perfringens*.

A cultura, em condições de anaerobiose, principalmente em meios mistos (Tarozzi) e líquidos (Bonnel e Brewer), permitiu a demonstração evidente daquele microrganismo. A pesquisa do *Clostridium tetani* no coto umbilical de 4 recém-nascidos normais foi negativa.

A inoculação do triturado do coto umbilical de recém-nascidos com tétano, em camundongos, foi positiva em 8 casos das 16 amostras inoculadas (50%), demonstrando este fato que o processo da cultura é mais sensível que o da inoculação.

A prova de soro-neutralização, em camundongos, permitiu a caracterização definitiva do *Clostridium tetani*.

Provavelmente, a quantidade de toxina presente no coto está, na maioria dos casos, abaixo do limite capaz de provocar, no animal sensível, o tétano experimental. De qualquer modo, demonstramos aí a presença do germe específico (*Clostridium tetani*), sendo este o foco principal da toxinfecção tetânica. No que diz respeito ao umbigo ressecado post mortem,

o encontro do *Clostridium tetani* foi menos freqüente. Assim, com a prática das culturas de 13 amostras, somente isolamos aquele microrganismo em três oportunidades (23%), enquanto a inoculação em camundongos do umbigo triturado foi negativa.

A análise de nosso material permite alguns outros comentários.

A bacterioscopia pelo método de Gram, no material examinado, não constitui método de valor para um diagnóstico de suspeita do tétano, pois estão praticamente ausentes as formas bacilares esporuladas, bem características do *Clostridium tetani*.

A bacterioscopia das culturas em meios líquidos e mistos, principalmente depois de uma semana, em temperatura ambiente, permite revelar numerosas formas esporuladas com os caracteres morfológicos e tintoriais do *Clostridium tetani*, ao lado de formas capsuladas do *Clostridium perfringens*. Outros microrganismos, assim como o *Bacillus subtilis*, constituem achado microscópico freqüente no referido material. Demonstramos, com relativa freqüência, a presença do *Clostridium perfringens* no material que estudamos, fato que demonstra a existência de condições biológicas favoráveis à proliferação de germes anaeróbios, em geral, no coto umbilical mumificado.

O estudo da atividade toxigênica das amostras isoladas revelou baixa toxigenicidade em relação à amostra padrão que é comumente utilizada no preparo da toxina tetânica.

AGRADECIMENTOS

Desejamos expressar nosso agradecimento aos Profs. Carlos da Silva Lacaz e José de Toledo Mello, pela sua orientação e conselhos; aos Drs. Rosalvo Guidolin e Alcino Corrêa, do Instituto Pinheiros, pela sua eficiente colaboração; ao Dr. Dácio Pinheiro, Chefe do Grupo de Tétano da Clínica Pediátrica do Hospital das Clínicas, pelos cotos umbilicais mumificados e umbigos ressecados usados no presente trabalho, bem como por algumas referências bibliográficas; e ao Dr. Luís Rey, pelos valiosos conselhos na redação deste trabalho.

RESUMO

O reduzido número de vêzes em que se conseguiu isolar o *Clostridium tetani*, em casos de tétano neonatal, levou à divisão dos autores quanto à etiologia desta doença.

Examinamos 20 amostras de coto umbilical mumificado (16 de casos tetânicos e 4 normais) e 13 umbigos ressecados post mortem, de tetânicos.

Utilizando o meio de Bonnel, o de ágar-sangue e outros, conseguimos isolar o *Clostridium tetani* em 87,5% dos côtos umbilicais e em 23,0% dos umbigos tetânicos. Isolou-se também o *Clostridium perfringens* em 13 casos, demonstrando a existência de condições de anaerobiose que favorecem o desenvolvimento de patógenos anaeróbios, no coto umbilical.

A identificação do *Clostridium tetani* por inculação das culturas em camundongos (prova de soro-neutralização), foi positiva nos 14 casos, enquanto a inoculação de triturado de órgãos só foi positiva em 8 casos, a partir do coto umbilical. A razão desta diferença estaria na baixa concentração de toxina existente neste material.

Em 4 casos foram obtidas culturas puras (anteriormente só conseguidas por Kitasato, 1889) e estudadas em seus aspectos morfológicos.

Nossas observações reforçam a teoria clostrídica do tétano do recém-nascido, que padecia das falhas no isolamento do *Clostridium tetani*, e mostram sua localização preferencial no coto umbilical mumificado, que seria o principal foco da toxiinfecção.

SUMMARY

The few times that it has been possible to isolate *Clostridium tetani*, in cases of tetanus neonatorum, has led to divided opinions among authors as to the etiology of this disease.

We examined 20 samples of the mummified umbilical stump (16 tetanus-infected and 4 normal cases) and 13 post mortem dried navels obtained from tetanus-infected patients.

Utilizing Bonnel's medium, agar-blood and others, we were able to isolate *Clostridium tetani* in 87.5% of the umbilical stumps and in 23.0% of the umbilici obtained from tetanus-infected patients. We also isolated *Clostridium perfringens* in 13 of the cases, thus demonstrating the existence of an anaerobic condition which favors the growth of anaerobic germs on the umbilical stump.

The identification of *Clostridium tetani* through inoculation of cultures in mice (serum-neutralization test) was positive in 14 cases, while inoculation of ground organs tested was positive in 8 cases, starting from the umbilical stump. The reason for this difference would lie in the low toxin concentration found in this material.

In four of the cases pure cultures were obtained (previously obtained only by Kitasato in 1889) and their morphobiological aspects were studied.

Our observations would seem to give added strength to the clostridial theory of tetanus in the newborn, which was lacking with regard to the problem of isolating *Clostridium tetani*. Our observations would also seem to show the preferential localization of *Clostridium tetani* in the mummified umbilical stump, which would be the main focus of the toxi-infection.

BIBLIOGRAFIA

1. BAHIA, A. — Tétano neo-natal. *Matern. e Inf.* (S. Paulo) 12:189-200, 1953.
2. BEUMER — Zur Ätiologie des Trismus sive Tetanus neo-natorum. *Z. Hyg. Infekt.-Kr.* 3:242-280, 1888.
3. BIER, O. — Bacteriologia e imunologia em suas aplicações à medicina e à higiene, 9ª ed. Melhoramentos, São Paulo, 1959, pp. 90-91.
4. BONNEL, D. H. — Le controle bactériologique des produits biologiques au moyen d'un milieu permettant la culture à l'air libre des germes aérobies et anaérobies. *Ann. Inst. Pasteur* 79:422-428, 1950.
5. KITASATO, S. — Ueber den Tetanus Bacillus. *Z. Hyg. Infekt.-Ar.* 7:225-233, 1889.
6. MATTOS, G.; PEREIRA, A.; LACAZ, C. S.; FERREIRA, M. — Contribuição para o estudo etiológico do tétano umbilical. *Pediat. prat.* (S. Paulo) 22:73-84, 1951.
7. PEIPER, E. — Ein Beitrag zur Ätiologie des Trismus sive Tetanus neonatorum. *Dtsch. Arch. klin. Med.* 47:182-191, 1890-91.
8. PINHEIRO, D. — Contribuição para o estudo da etiologia do tétano do recém-nascido. Tese, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1962.
9. PINHEIRO, D. — Tétano do recém-nascido; resultados da inoculação em camundongos de coto umbilical mumificado de recém-nascido com tétano. *Pediat. prat.* (S. Paulo) 22:73-84, 1951.