

## ESTUDOS SOBRE A PATOGENICIDADE DE UMA NOVA ESPÉCIE DE **CHROMOBACTERIUM\***

CLEOMENES REIS \*\* MAURICIO SERGÍO B. LEITE \*\*\*  
MARIA LUCIA MENDONÇA DA VEIGA \*\*\*\* MARIO DINIZ \*\*\*\*

### RESUMO

Os AA. pretenderam verificar a patogenicidade de uma nova amostra de *Chromobacterium* (ATCC 29094) recentemente isolada, e responsabilizada pela infecção natural em suínos.

Experimentalmente foram utilizadas algumas espécies de animais, entre eles macacos "prego" (*Cebus apella libidinosus* ou *macrocephalus*), sendo feitas comparações entre o poder patogênico da amostra com outras de *Chromobacterium violaceum*, citada na literatura.

Observaram que altas concentrações da nova espécie causam, rapidamente, quadro toxêmico e septicêmico. Em menores concentrações pôde-se verificar o desencadeamento da doença e septicemia, comparáveis aos casos de infecção natural provocados pelas espécies até então conhecidas.

As similitudes e prováveis diferenças entre a infecção causada pela nova amostra e as espécies já descritas são discutidas.

### INTRODUÇÃO

Os trabalhos sobre a patogenicidade de *Chromobacterium* são raros. Dauphinais e col.<sup>3</sup>, em 1968, afirmaram que a primeira referência sobre o assunto fora realizada por Wooley, em 1904, descrevendo os microrganismos como causa de infecção natural em búfalos.

Goves e col.<sup>5</sup>, em 1969, relataram um caso septicêmico, com abscessos hepáticos, pulmonares e esplênicos, causados por *Chromobacterium* em 10 animais do Zoo Nacional de Kuala Lumpur, Malásia (9 macacos e 1 urso polar). O quadro clínico por eles observado, era depressão da atividade motora, recusa de alimentos e morte.

Sippel e col.<sup>10</sup> identificaram *Chromobacterium violaceum* em lesões características em suínos, entre as quais abscessos nas glân-

\*\* Prof. Titular do Dept<sup>o</sup>. de Microbiologia IPT-UFGO.

\*\*\* Prof. Assistente Dept<sup>o</sup>. de Patologia FM-UFGO.

\*\*\*\* Profs. Assistentes, Dept<sup>o</sup>. de Microbiologia IPT-UFGO.

dulas parótidas e nódulos linfáticos mandibulares.

Em, 1970, Johnsen e col.<sup>6</sup> fizeram uma comunicação de caso fatal de septicemia em macaco.

Johnson e col.<sup>7</sup> relataram um caso de septicemia fatal humana de *Chromobacterium*, em uma garota de 9 anos de idade, como sendo o 6º. caso de infecção fatal humana nos Estados Unidos da América. A necropsia revelou fluidos sanguinolentos nos espaços pleurais, lesões focais visceroparietais no pulmão esquerdo e na superfície epicárdica; petéquias hemorrágicas; fluido amarelo-avermelhado na cavidade peritoneal; abscessos no fígado, com exsudato contendo leucócitos mono e polimorfonucleares.

Wijewanta e col.<sup>12</sup>, em 1969, isolaram *Chromobacterium violaceum* de lesões hepáticas de porcos abatidos em matadouros, abscessos branco-acinzentados de 1 a 3 cms, cheios de pús.

Em 1972, Reis e col.<sup>9</sup> isolaram *Chromobacterium* de águas de nascente de um regato e de um bebedouro de pocilgas, em Goiânia, durante um surto septicêmico em suínos. O microrganismo apresentou características bioquímicas próprias, deixando-se suspeitar tratar-se de uma nova espécie. Em seu estudo, incluiu-se o da patogenicidade e comparação com as descrições dos casos conhecidos para as espécies até então identificadas. Um grande número de animais foi submetido à inoculações, todavia, neste trabalho são citados apenas aqueles que tiveram as suas lesões observadas macro e microscopicamente

e os germes reisolados à partir dessas lesões.

#### MATERIAL E MÉTODO

Na experiência foram utilizados 6 cobaios, 4 macacos "prego", 2 coelhos e 10 camundongos.

As bactérias foram inoculadas em suspensão salina a 0,85%, sendo que o número provável aproximado de microrganismos por ml foi calculado com base colorimétrica na escala de MacFarland<sup>2</sup>, a partir de crescimento em meio sólido (agar trypticase soja).

Foram feitas inoculações do microrganismo por via intraperitoneal, oral e intra-muscular, nos cobaios, coelhos e camundongos.

Nos macacos fizeram-se apenas inoculações intraperitoneais e por via oral.

Foram inoculadas suspensões contendo  $10^4$ ,  $3 \times 10^4$  e  $6 \times 10^4$ , bactérias por ml de salina.

Os cobaios e macacos que morreram foram submetidos à necropsia, sendo as lesões examinadas macro e microscopicamente. Os órgãos dos animais necropsiados foram fixados em formol a 10% e examinados no laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina da UFGO.

As observações microscópicas foram feitas através de colorações pela Hematoxilina-Eosina<sup>4</sup> e pelo Gram, modificado por Humberstone<sup>8</sup>.

Os microrganismos foram reisolados em tioglicolato de sódio (Brewer) e em agar sangue de cavalo.

#### RESULTADOS

Quatro camundongos inoculados intraperitonealmente, dois com  $3 \times 10^4$  e dois com  $6 \times 10^4$  bactéria/ml morreram entre 4 a 6 horas. Estas mesmas concentrações, inoculadas não mataram outros 4 camundongos até uma semana.

O camundongo inoculado intraperitonealmente com  $10^4$  bactéria/ml morreu em 24 horas, enquanto que esta mesma concentração inoculada por via oral, foi incapaz de matar outro camundongo até 10 dias.

Dois cobaios e dois coelhos inoculados intraperitonealmente com  $3 \times 10^4$  e  $6 \times 10^4$  bactéria/ml de salina, também morreram entre 4 a 6 horas.

Dois outros cobaios inoculados com  $3 \times 10^4$  e  $6 \times 10^4$  bactéria/ml por via oral não morreram até 2 semanas. Também até duas semanas com inoculações intraperitoneal de  $10^4$  bactéria/ml em outros dois cobaios, observou-se a morte dos animais. Os microrganismos foram re isolados a partir dos órgãos dos animais inoculados.

Os macacos de idade e peso muito variáveis, apresentaram os seguintes resultados: o macaco A, menor em tamanho, bem jovem, de menor peso corporal, morreu 6 dias após a inoculação intraperitoneal de  $3 \times 10^4$  bactérias/ml e concomitante inoculação por via oral, de  $3 \times 10^4$  bactéria/ml.

O macaco B, maior, de peso maior, também jovem, morreu após 23 dias, com inoculação intraperitoneal, em dose única, de  $3 \times 10^4$  bactéria/ml.

Esta mesma dose, por via intraperitoneal foi administrada a outros dois macacos (J e JR) maiores, de maior peso e mais idosos, sendo que neles se administrou, posteriormente, a cada 5 dias, pela mesma via, nova inoculação intraperitoneal com  $10^4$  bactérias.

O macaco J morreu após 51 dias, enquanto que o JR morreu após 66 dias. Durante este tempo foram feitos leucogramas nos animais J e JR, 24 horas depois de cada inoculação subsequente, tendo sido feitos estes mesmos exames nos animais, antes da primeira inoculação, observando-se evolutivamente o aparecimento de intensa linfocitose em ambos os animais.

Os animais que morreram poucas horas após a inoculação mostravam rapidamente depressão, diminuição da atividade motora e sensorial, com perda de reflexos.

Os animais que morreram duas horas depois da inoculação mostravam depressão motora, recusa de alimentos. A necropsia, estes animais revelaram fluidos sanguinolentos no espaço peritoneal e abscessos no fígado (pequenos, tendo os maiores um tamanho de 0,4 cm), de coloração amarelo-acinzentado; lesões focais na superfície epicárdica.

Microscopicamente, as alterações encontradas em todos os cobaios, foram basicamente, as mesmas, variando em extensão e intensidade.

Detalhadamente estas alterações podem ser assim descritas: 1 — Pele: local da inoculação, dermatite aguda inespecífica, su-

purativa. Presença de bastonetes Gram-negativos.

2 — **Músculos:** parede abdominal, miosite aguda supurativa, com necrose de rhabdomicitos. Agrupamento de bastonetes Gram-negativos.

3 — **Peritônio:** peritonite aguda inespecífica.

4 — **Abscesso Hepático:** cobaios que morreram 4-6 horas após a inoculação ( $3 \times 10^4$  bactéria/ml) apresentaram hepatite aguda não supurativa, generalizada e de moderada intensidade.

Os cobaios que morreram 1 a 2 semanas após a inoculação apresentaram abscessos sub-capsulares e intra-parenquimatosos, e presença de bastonetes Gram-negativos, em agrupamentos, no local. Todos os cobaios examinados mostravam no fígado esteatose e microgoticulas, sem localização preferencial, às vezes em faixas.

5 — **Coração:** zona de enfarte recente, no músculo papilar. Em todos os cobaios, encontrou-se comprometimento endocárdico mais ou menos intenso representado por vacuolização da íntima (endocardite serosa focal ou zonal), e mesmo infiltrado com depósito de material indistinguível (de fibrina num cobaio que morreu após 4-6 horas.)

6 — **Pulmões:** presença de focos de atelectasia e, de pneumonia intersticial inespecífica supurativa (foco) num dos cobaios que morreu após 1-2 semanas.

7 — **Intestinos:** intensa hiperplasia dos folículos linfóides.

8 — **Baço:** hiperplasia dos folículos linfóides.

9 — **Artérias:** (baço, coração,

pulmões, fígado, testículos) encontrou-se vacuolização de íntima e mesmo edema seroso nas paredes e periarteriolar (arterite serosa), sendo que algumas apresentaram anel de células inflamatórias mononucleares em torno de si. A luz destes vasos, no baço, acha-se virtualmente obstruída.

#### COMENTÁRIOS E DISCUSSÃO

Os camundongos não suportaram 0,1 ml de suspensão contendo  $10^4$  bactérias por via intraperitoneal. Não morreram com a mesma dose, por via oral.

Toxemia violenta foi observada com a inoculação intraperitoneal de  $3 \times 10^4$  e  $6 \times 10^4$  bactérias, nos animais de laboratório, cobaios, camundongos e coelhos.

Obviamente, as mesmas doses empregadas por via oral não foram tão ativas e fatais, quanto as introduzidas intraperitonealmente.

Com relação aos leucogramas realizados nos macacos J e JR observou-se que os animais apresentaram reações idênticas frente à 1ª. inoculação: leucopenia com linfocitose e consequente neutropenia e desaparecimento dos eosinófilos.

Frente a 2a. e 3a. inoculações, o macaco JR apresentou o mesmo quadro observado na 1ª. inoculação, mas sem queda de leucócitos, apresentando aliás, uma discreta leucocitose. O macaco J apresentou uma reação diferente após a 2a. inoculação, com elevado número de leucócitos e alteração na contagem diferencial no sentido de regeneração do quadro inicial. Depois da 3a. e da 4a. inoculação, este a-

nimal apresentou o mesmo quadro da 1a. inoculação.

Pelas observações levadas a efeito, conclui-se que a nova amostra bacteriana, possível nova espécie de *Chromobacterium* possui poder patogênico comparado aos das espécies conhecidas.

#### SUMMARY

#### STUDIES ON THE PATHOGENESIS OF NEW SPECIE OF CHROMOBACTERIUM

The literature contains reports of human illness by chromogenic bacteria and pathogenicity for animals.

A new bacterium of this genus, isolated from a small brook, probable new species, with different biochemical characteristics, were pathogenic for mice, guinea pigs, rabbits, and monkeys (*Cebus apella libidinosus*).

Were also able to infect pigs, naturally.

#### AGRADECIMENTOS

Agradecemos a colaboração da Residente em Microbiologia Dorivan Chaves da Rocha, dos acadêmicos, Ayres Manoel de Souza, da escola de Veterinária da UFGO.; Ildefonso Ribeiro Neto e Amélia Fortunato Ricardo, da Faculdade de Medicina da UFGO., que nos auxiliaram gentilmente, na execução do presente trabalho.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDEW, W. — Comparative Hematology — Grunne & Stratton, N.Y. 1a. ed., 155, 1965.
2. BIER, O. — Bacteriologia e Imunologia. Ed. Melhoramentos, SP., 11a. ed. — 786, 1963.
3. DAUPHINAIS, R. M. & ROBBERG, G.G. — Fatal infection due to *Chromobacterium violaceum*. The Am. J. Clin. Path. 50:592-597, 1968.
4. FRANKEL, A.; REITMAN, S. & SONNENWIRTH, A.C. — Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis. The C.V. Mosby, Co., ST. Louis, 1a. ed. 1:936-938, 1970.
5. GROVES, M.G.; STRAUSS, J.M.; ABBAS, J. & DAVIS, C.E. — Natural infections of gibbons with a bacterium producing violet pigment. The J. Infect Dis. 120: 605-610, 1969.
6. JOHNSON, D. C.; PULLIAN, J.D. & TANTICHARONENYUS, P. — *Chromobacterium septicum* in the gibbon. The J. Infect Dis. 122:563, 1970.
7. JOHNSON, W.M.; DISALVO, A.F. & STEUER, R.R. — Fatal *Chromobacterium violaceum* septicemia. Amer. J. Clin. Path. 56:400-406, 1971.
8. MILNE, J.A. — Introduction to the diagnostic Histopathology of the Skin. Edward Arnold (publishers) 1a. ed. 348-349, 1972.
9. REIS, C.; PEREIRA, E.; CAETANO DE SOUZA, O.; DINIZ, M.A. & KOLEILAT, M.N.M. — Isolamento de possível nova espécie de *Chromobacterium* em águas poluídas. Provável agente etiológico de surto septicêmico em suínos, no Município de Goiânia, Estado de Goiás, Fev. 1972. Rev. Pat. Trop. 2: 283-287, 1972.
10. SIPPEL, W.L.; MEDINNA, G. & ATWOOD, M.B. — Outbreaks of diseases in animals associated with *Chromobacterium violaceum*. The diseases in swine. J.A.V.M.A. 124: 470-476, 1954.
11. SNOWE, R.J. — *Chromobacterium violaceum* pathogenic for man. J. Infect. Dis. 123: 226, 1971.
12. WIJEWANTA, E. A. & WETTIMUNY, S.G. — *Chromobacterium violaceum* infection in pigs. Res. Vet. Sci. 10 389, 1969.