

**COMPARAÇÃO ENTRE TÉCNICA MANUAL E SISTEMA AUTOMATIZADO
PARA ANÁLISE DE CULTURAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO EM
SUSPEITAS DE MENINGITES.**

**COMPARISON BETWEEN MANUAL AND AUTOMATED SYSTEM FOR
ANALYSIS OF CULTURES IN MENINGITIS SUSPICIOUS CEREBROSPINAL
FLUID.**

Culturas de líquido cefalorraquidiano em suspeitas de meningites.

Artigo Original

**Lenise da Cruz Peratz Leite⁽¹⁾
Maria Terezinha Carneiro Leão⁽²⁾
Wesley Sousa Borges⁽³⁾**

RESUMO

As meningites infecciosas são problemas de Saúde Pública sendo responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade. Conduzimos a presente pesquisa com o objetivo de comparar culturas de líquido cefalorraquidiano (LCR) pelo método de semeadura em meios de cultura tradicional (manual) e no procedimento automatizado. Foram analisadas 85 amostras de pacientes internados no Instituto de Neurologia de Curitiba (INC), com indicação clínica de infecção entre os períodos de março e setembro de 2012. Destas, apresentaram 32 bactérias (37,65%) de interesse patogênico e 53 (62,35%) não apresentaram crescimento bacteriano. Os organismos identificados na metodologia manual e automatizados foram, *Staphylococcus*

¹Bacharel em Biomedicina das Faculdades Integradas do Brasil – UniBrasil. lenise.peratz@yahoo.com.br

²Co-orientadora Médica Infectologista do Instituto de Neurologia de Curitiba - INC.

³Orientador Biomédico Msc. em Análises Clínicas e docente da Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG.

epidermidis (n=9; 10,59%), *Staphylococcus aureus* (n=2; 2,35%), *Enterobacter aerogenes* (n=2; 2,35%), *Klebsiella pneumoniae* (n=2; 2,35%), *Escherichia coli* (n=1; 1,18%), estafilococos coagulase negativos (n=5; 5,88%), *Streptococcus salivarius* (n=1; 1,18%), *Staphylococcus haemolyticus* (n=1; 1,18%), *Streptococcus mitis oralis* (n=1; 1,18%), *Pseudomonas aeruginosa* (n=3; 3,53%), *Staphylococcus hominis* (n=1; 1,18%), *Micrococcus sp.* (n=2; 2,35%), *Serratia marcescens* (n=2; 2,35%). Através da metodologia automatizada foram identificadas 27 amostras (31,8%) positivas para algum patógeno e 4 amostras (4,7%) positivas pela metodologia manual. Concluiu-se que divergentes resultados encontrados nas técnicas manuais e automatizadas suscita uma discussão a respeito dos protocolos microbiológicos, especialmente nos procedimentos realizados de forma manual.

Descritores: líquido cefalorraquidiano; líquor; culturas; meningites; Bactec[®].

ABSTRACT

The infectious meningitis is a public health problems are responsible for high morbidity and mortality. We conduct this research with the objective of comparing cultures of cerebrospinal fluid (CSF) by the method of seeding in culture media traditional (manual) and automated procedure . We analyzed 85 samples from patients admitted to the Institute of Neurology in Curitiba (INC) with clinical suspicious of infection at the period between March and September 2012. Of these, 32 showed bacteria (37.65%) interest pathogenic and 53 (62.35%) showed no bacterial growth. The organismos identified manual and automated methodology were *Staphylococcus epidermidis* (n=9; 10,59%), *Staphylococcus aureus* (n =2; 2,35%), *Enterobacter aerogenes* (n=2; 2,35%), *Klebsiella pneumoniae* (n=2; 2,35%), *Escherichia coli* (n=1, 1,18%), coagulase-negative staphylococci (n=5; 5,88%), *Streptococcus salivarius* (n=1, 1,18%); *Staphylococcus haemolyticus* (n=1, 1,18%), *Streptococcus mitis oralis* (n=1; 1,18%), *Pseudomonas aeruginosa* (n=3; 3,53%), *Staphylococcus hominis* (n=1;

1,18%), *Micrococcus sp.* (n=2; 2,35%), *Serratia marcescens* (n=2; 2,35%). Through automated methodology identified 27 samples (31.8%) positive for any pathogen and four specimens (4.7%) positive by the manual method. We conclude that different results found in manual and automated techniques raises a discussion of microbiological protocols, especially in procedures performed manually.

Keywords: cerebrospinal fluid; CSF; cultures; meningitis; Bactec[®].

1. INTRODUÇÃO

O líquido cefalorraquidiano (LCR) também chamado de líquido cefalorraquidiano (LCE) ou líquido espinal, foi descrito em 1764 por Cotugno, é um fluido biológico que preenche os ventrículos e o espaço subaracnóideo ao redor do cérebro e da medula espinal, tem como função distribuir nutrientes pelo tecido nervoso, retirar resíduos metabólicos, veicular as secreções da hipófise e amortecer as vibrações e choques que atingem o eixo encefalomedular⁽¹⁾.

O líquido em suas condições fisiológicas é límpido, incolor e possui aspecto de “água de rocha” qualquer ligeira alteração nesse aspecto ou na cor pode indicar alguma patologia. Um LCR levemente turvo, descrito como “água de arroz”, sugere a presença de células sanguíneas e/ou micro-organismos. O aspecto leitoso é associado à presença de número aumentado de leucócitos, bactérias, fungos ou níveis elevados de proteínas e lipídeos. Em relação à cor, a xantocromia consiste em coloração rosada, laranja ou amarela e é devida comumente à lise de eritrócitos e a degradação de hemoglobina⁽²⁾. O LCR auxilia no diagnóstico e na avaliação de condições infecciosas, inflamatórias e não infecciosas (vasculares), envolvendo o cérebro, medula espinal, meninges, sendo obtido através de punção lombar⁽³⁾.

Uma das doenças que são diagnosticadas através do líquido são as meningites. As meningites infecciosas são problemas de Saúde Pública sendo responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade. São doenças cuja notificação é compulsória e a investigação obrigatória; podem causar morte ou deixar os sobreviventes com sequelas neurológicas graves (4).

No laboratório de análises clínicas que realiza esta rotina, a cultura do LCR é processada no setor de microbiologia para identificação de patógenos. Na meningite bacteriana, é importante identificar o antimicrobiano que irá combater esse patógeno no menor tempo possível, por isso que a cultura com antibiograma é essencial (5).

Em qualquer laboratório clínico; a partir do método de cultura tradicional em meios de cultura com ágar; o tempo médio para obtenção de resultados que levarão a um diagnóstico é de 24 horas no caso de meningites bacterianas (6).

Para que bactérias gram-positivas e gram-negativas se desenvolvam são utilizados meios de culturas apropriados como o ágar chocolate que permite o isolamento dos principais patógenos relacionados a esta patologia incluindo os fastidiosos como, *Haemophilus influenza* e *Neisseria meningitidis* (7).

Em laboratório de microbiologia o resultado do crescimento bacteriano pode ser obtido até no mínimo 24 horas após semeadura. Caso haja suspeita de meningite são liberados outros resultados mais rápidos como, por exemplo, os exames de coloração de Gram, coloração de Ziehl-Neelsen (álcool-ácido-resistentes) e da prova com tinta da China, para que a conduta terapêutica seja rápida, garantindo maior segurança para o paciente (8).

Nesse estudo optou-se por semear o LCR em meios de cultura com ágar (método tradicional) e em frascos usados para hemocultura automatizada, simultaneamente. Esses frascos que foram utilizados no estudo pertencem ao equipamento Bactec® 9050 da empresa BD – Becton & Dickinson (9). Essa técnica pode agilizar o processo, já que alguns sistemas automatizados são capazes de detectar culturas positivas em poucas horas. O aparelho

Bactec[®] baseia-se na detecção da produção de CO₂ pelos micro-organismos (detectado por sinal fluorescente). Um *software* analisa estas variações e em caso positivo é emitido um sinal sonoro. Nesse sistema existem resinas que facilitam a lise de leucócitos (liberando bactérias fagocitadas) e neutralizam a ação de antimicrobianos (facilitando o crescimento microbiano) aumentando a superfície de crescimento microbiano, sendo que os resultados positivos são obtidos, na maioria dos casos, em poucas horas ⁽¹⁰⁾.

Fazendo analogia com outros fluidos corporais, e seguindo as recomendações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) surgiu à possibilidade de utilização simultânea do método tradicional de cultura em meios com ágar e do método automatizado utilizado pelo equipamento Bactec[®], que poderia acelerar o procedimento, já que esses sistemas detectam culturas positivas em poucas horas. Frente ao exposto, conduzimos o presente estudo com o objetivo de comparar culturas de LCR em método de semeadura em placas tradicionais e o procedimento automatizado em frascos usados para hemocultura (Sistema Bactec[®]) a fim de obter crescimento microbiano com resultados rápidos, para que posteriormente auxilie o tratamento eficaz do paciente.

2. CASUÍSTICA E MÉTODO

Foi realizado um estudo descritivo para comparação entre a técnica manual e sistema automatizado na análise de culturas de líquido cefalorraquidiano em suspeitas de meningites em parceria com o Instituto de Neurologia de Curitiba (INC). As amostras foram obtidas por punção liquórica realizada pelos médicos do próprio hospital que seguiram uma padronização interna do INC e encaminhada ao laboratório para realização do exame. Na presente pesquisa foi apenas realizado um levantamento de dados, que seguiram os seguintes critérios de inclusão: Todo resultado laboratorial de cultura de líquido obtido por punção lombar ou ventricular com suspeita clínica de infecção. Foram excluídos da pesquisa todos os resultados

laboratoriais de culturas de líquido obtido por punção, por outras doenças suspeitas, que não infecção. Os resultados coletados das culturas de líquido das referidas amostras foram submetidos aos procedimentos manuais e automatizados simultaneamente. A semeadura do material foi realizada em meios de cultura (ágar-chocolate) e em meios de cultura automatizado pelo sistema Bactec[®] 9050. No método manual foram realizadas a semedura por esgotamento e logo em seguida essas placas foram incubadas em estufa a 35°C por no mínimo 24 horas em jarra de tensão de CO₂. Já no sistema automatizado as amostras foram inoculadas de forma asséptica nos frascos do sistema Bactec[®] 9050 de acordo com as recomendações do fabricante. Quando essas amostras apresentavam sinal sonoro (indicando positividade), os frascos eram removidos do aparelho e uma pequena alíquota era utilizada para o exame de coloração de Gram⁽¹¹⁾, dando um parecer parcial a equipe médica do INC. Esses procedimentos foram realizados pelos profissionais do laboratório do referido hospital (INC).

As culturas positivas no Bactec[®] das sementeiras de líquido realizadas foram comparadas e avaliadas de acordo com a positividade das culturas em placas (meios com ágar). As análises estatísticas aplicadas aos resultados dos procedimentos manuais e automatizadas utilizaram-se do método estatístico de Frequência Absoluta Relativa Percentual, os resultados foram analisados através de planilha Excel (Microsoft Windons[®]).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

85 amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) foram submetidas a testes microbiológicos em meios de cultura e analisadas pelo método manual e pelo método automatizado simultaneamente. A finalidade da utilização de metodologias diferentes comparou resultados apresentados pelo sistema automatizado em relação ao método manual, para a detecção de diferentes bactérias nas amostras testadas. Após a coleta de dados dos

resultados foi calculada a frequência dos exames positivos e negativos por ambas as metodologias, fracionando-os por meses. Do total das amostras testadas 4 (4,70%) se mostraram positivas pelo método manual e 27 (31,8%) pelo sistema automatizado.

Através dos dois métodos de cultura utilizados neste estudo foram identificadas bactérias como apresentadas na Figura 1.

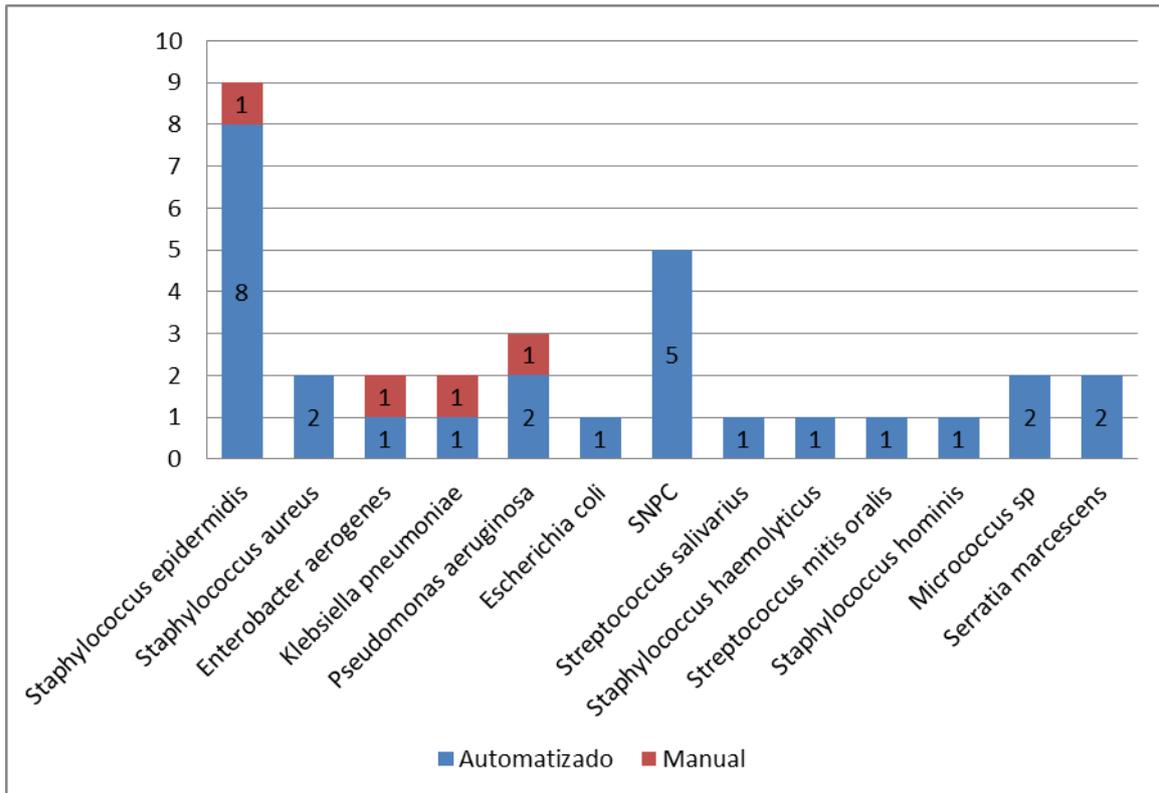


Figura 1 – bactérias encontradas entre o método manual e automatizado.

O método manual apresentou menor sensibilidade em comparação com a tecnologia automatizada, embora seja a metodologia mais empregada nos laboratórios de análises microbiológicas do país devido os custos, mas claramente podem favorecer a contaminação de agentes secundários e que não o agente causal ⁽¹²⁾.

MARÇO

MÉTODOS	Fi (freq.)	POSITIVO	Fri%	NEGATIVO	Fri%
MANUAL	7	0	0%	7	100,0%

AUTOMATIZADO	7	1	14,3%	6	85,7%
ABRIL					
MÉTODO	Fi (freq.)	POSITIVO	Fri%	NEGATIVO	Fri%
MANUAL	28	1	3,57%	27	96,43%
AUTOMATIZADO	28	14	50,0%	14	50,0%
MAIO					
MÉTODO	Fi (freq.)	POSITIVO	Fri%	NEGATIVO	Fri%
MANUAL	21	0	0%	21	100,0%
AUTOMATIZADO	21	3	14,3 %	18	85,7%
JUNHO					
MÉTODO	Fi (freq.)	POSITIVO	Fri%	NEGATIVO	Fri%
MANUAL	15	1	6,67%	14	93,33%
AUTOMATIZADO	15	6	40,0%	9	60,0%
JULHO					
MÉTODO	Fi (freq.)	POSITIVO	Fri%	NEGATIVO	Fri%
MANUAL	7	0	0%	7	100,0%
AUTOMATIZADO	7	0	0%	7	100,0%
AGOSTO					
MÉTODO	Fi (freq.)	POSITIVO	Fri%	NEGATIVO	Fri%
MANUAL	3	2	66,67%	1	33,33%
AUTOMATIZADO	3	3	100,0%	0	0%
SETEMBRO					
MÉTODO	Fi (freq.)	POSITIVO	Fri%	NEGATIVO	Fri%
MANUAL	2	0	0%	2	100,0%
AUTOMATIZADO	2	0	0%	2	100,00%

Tabela 1- frequência dos exames positivos e negativos fracionados por meses.

Conforme apresentado na tabela no mês de março de 2012, a amostragem foi comparativamente menor. Foram 7 amostras avaliadas, dessas amostras semeadas e inoculadas pelos dois métodos, apenas 1 amostra foi positiva para crescimento bacteriano, essa amostra positiva foi identificada no sistema automatizado (14,3%). A bactéria identificada e responsável pelo crescimento foi o *Staphylococcus aureus* bactéria de grande importância em ambientes nosocomiais e uma espécie de maior interesse médico, responsável por óbitos em pacientes hospitalizados⁽¹³⁾.

No mês de abril a amostragem foi comparativamente maior, 28 amostras. Dessas 1 amostra positivou no sistema manual (3,57%), contra 14 amostras no automatizado (50,0%). Das bactérias que apresentaram crescimento pelo método automatizado foram identificadas *Micrococcus sp.* em 1 amostra (7,14%), em 2 amostras *Serratia marcescens* (14,3%) e em 11 amostras estafilococos coagulase-negativos (ECN) (78,6%). A que apresentou positividade nos dois métodos foi o ECN (*Staphylococcus epidermidis*). Nesse mês observou-se que o sistema automatizado foi de grande importância para o diagnóstico de meningites por patógenos. O *Staphylococcus epidermidis* tem sido nas últimas décadas o principal causador de infecções hospitalares⁽¹⁴⁾.

Os estafilococos coagulase-negativos são importantes agentes etiológicos das infecções nosocomiais e são frequentemente considerados como contaminantes, entretanto, existem infecções graves associadas aos ECN. O *Staphylococcus epidermidis* é a espécie mais frequente das bacteremias por ECN e estão associados em diferentes situações clínicas⁽¹⁵⁾.

No mês de maio de 2012, das 21 amostras semeadas e inoculadas observou-se 3 amostras de culturas positivas (14,3%). Tais culturas apresentaram positividade quando analisadas pelo método automatizado e, em contraste (0%) das amostras apresentaram-se positivas quando analisadas pelo método manual.

Do total de amostras desse mês 2 foram ECN (66,67%) e 1 amostra apresentou duas espécies bacterianas, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (33,33%). Desta forma reitera-se a importância do método automatizado como ferramenta auxiliar no diagnóstico médico ⁽¹⁶⁾.

No mês de junho de 2012 das 15 amostras analisadas, foi observado positividade no sistema automatizado para 3 amostras de ECN (50,0%), 1 amostra para *Micrococcus sp.* (16,67%), 1 amostra identificada com *Enterobacter aerogenes* (16,67%) e 1 amostra com *Escherichia coli* (16,67%). Desses apenas o *Enterobacter aerogenes* positivou no método manual e no método automatizado simultaneamente. O *Enterobacter aerogenes* é um patógeno que preocupa qualquer equipe médica, já que pode ser produtor de ESBL ⁽¹⁷⁾. As betalactamases formam um grupo de enzimas que podem hidrolisar o anel betalactâmico de penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos (antibióticos betalactâmicos). Dentre as bactérias que possuem essas enzimas, as que possuem grande importância em um ambiente hospitalar são as betalactamases de espectro ampliado (Extended-Spectrum Betalactamase - ESBL), pois conferem ampla resistência aos antimicrobianos que contêm o anel betalactâmico, rompendo-o com suas enzimas, causando a inativação e prejudicando sua eficácia ⁽¹⁸⁾.

A análise do mês de agosto de 2012 apresentou 3 culturas positivas. Deste total de amostras 2 foram identificadas através do sistema manual (66,67%) e todas deram positivas no sistema automatizado (100,0%). Dessas bactérias que foram recuperadas através do Bactec[®] apresentou-se 1 amostra constando *Klebsiella pneumoniae* (33,34%), 1 amostra de *Streptococcus mitis oralis* (33,34%) e 1 amostra com *Pseudomonas aeruginosa* (33,34%). As bactérias *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* foram observadas em ambos os métodos.

No mês de setembro de 2012 não houve positividade para os mesmos testes tanto na metodologia manual quanto na metodologia automatizada. Comparativamente não houve divergência em resultados.

AMOSTRAS ANALISADAS PELO MÉTODO MANUAL E AUTOMATIZADO

MÉTODO	Fi (freq.)	POSITIVO	Fri%	NEGATIVO	Fri%
MANUAL	85	4	4,70%	81	95,3%
AUTOMATIZADO	85	27	31,8%	58	68,2%

Tabela 2 – taxas para amostras analisadas pelo método manual e automatizado.

Conforme tabela 2, relatando o total de amostras do período de março de 2012 a setembro de 2012, que foram semeadas e inoculadas pelos dois métodos utilizados na pesquisa, observou-se que em relação a positividade do método manual, o sistema automatizado se mostrou mais sensível.

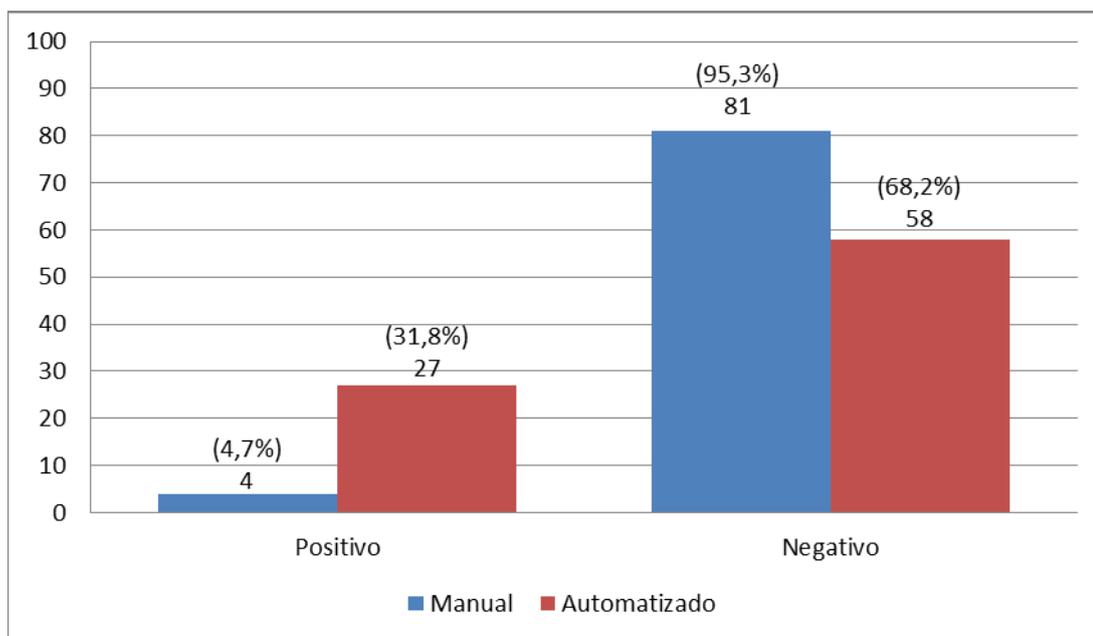


Figura 2 – positividade encontrada entre o método manual e automatizado.

4. CONCLUSÃO

Sistemas automatizados têm sido desenvolvidos com o objetivo de aumentar a sensibilidade e a rapidez da detecção de crescimento de agentes etiológicos responsáveis por infecções. São sistemas que incubam, agitam e monitoram constantemente os meios, para detecção rápida de crescimento microbiano ⁽¹²⁾. Como essa metodologia está isenta de boa parte da manipulação direta com os meios de cultura durante o procedimento das análises, torna-se menos sujeitas as contaminações externas durante esse procedimento operacional padrão (POP).

As comparações apresentadas entre as técnicas manuais e automatizadas de culturas para o diagnóstico de meningites bacterianas apresentaram diferenças significativas para positivities e negatividades. 31,8% das amostras apresentaram positividade em culturas de amostras de líquido através do método automatizado. Uma taxa expressiva contra 4,7% de positividade em culturas de amostras de líquido pelo método tradicional e manual. Esta identificação torna-se relevante especialmente porque a identificação das estirpes aponta para patógenos complicadores do quadro clínico do paciente como é visto em amostras que apresentaram o *Staphylococcus epidermidis*.

O *Staphylococcus epidermidis* tem sido, nas últimas décadas, o principal agente etiológico causador de infecções hospitalares conforme relatos de referências científicas ⁽¹⁴⁾. Os estafilococos coagulase-negativos (ECN) são importantes agentes etiológicos das infecções nosocomiais e são frequentemente considerados como contaminantes, entretanto, existem infecções graves associadas aos ECN. O *Staphylococcus epidermidis* é a espécie mais frequente das bacteremias por ECN e estão associados em diferentes situações clínicas ⁽¹⁵⁾.

Não obstante, resultados concordantes foram obtidos em meses como julho e setembro de 2012, onde os resultados laboratoriais das análises das colônias foram idênticos na técnica manual e automatizada o que sugere que, quando a técnica manual para estes testes

reproduzem o protocolo manual a rigor, poderá ser tão eficiente quanto a metodologia automatizada. Em contraste os resultados das análises nos meses de março, abril, maio, junho e agosto de 2012 obtidos através da técnica manual e automatizada, apresentaram resultados divergentes tanto para a metodologia manual quanto para a metodologia automatizada. Tal fato suscita uma necessidade para as discussões a respeito da credibilidade para os métodos manuais dentro do setor de microbiologia dos laboratórios de análises clínicas.

5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Instituto de Neurologia (INC) que cederam suas instalações para a execução desse estudo. As professoras Jannaina Ferreira de Melo Vasco e Ana Paula Weinfurter Lima, por orientar a primeira fase do mesmo. A professora Renata Lima Ludovico, por orientar a parte estatística dessa pesquisa. A médica infectologista responsável pelo Setor de Infectologia e Controle de Infecção Hospitalar do INC, Maria Terezinha Carneiro Leão.

6. REFERENCIAS

1. Strasinger S. Uroanálise e Fluídos Biológicos. 3 ed. São Paulo: Premier. 2000, p. 132.
2. Henry JB. Diagnosticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais. 20 ed. São Paulo: Manole. 2008, p. 472-473.
3. Deisenhammer A, et al. Guidelines on routine cerebrospinal fluid analysis. Report from an EFNS task Force. European Journal of Neurology 2006; 13: 913–922.

13. Santos AL, Santos DO, Freitas CC, Ferreira BLA, Afonso IF, Rodrigues CR, Castro HC. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. J Bras Patol Med Lab. 2007; 43(6): 413-423.
14. Prasad S, Nayak N, Satpathy G, Nag HL, Venkatesh P, et. al. Molecular e phenotypic characterization of *Staphylococcus epidermidis* in implant related infections. Indian J Med Res. 2012; 136: 483-90.
15. Góngora-Rubio F, Pignatari ACC, Costa LMD, Bortolloto VI, Machado AM, Góngora DVN. Significância clínica, epidemiologia e microbiologia das bacteremias por estafilococos coagulase-negativos em Hospital de Ensino. Ver Ass Med Brasil. 1997; 43(1): 9-14.
16. Qinfang Q, Eichelberger K, Kirby JE. Rapid Identification of *Staphylococcus aureus* in Blood Cultures by Use of the Direct Tube Coagulase Test. J Clin Microbiol. 2007; 45(7): 2267–2269.
17. Tzelepi E, et al. Detection of Extended-Spectrum b-Lactamases in Clinical Isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. J Clin Microbiol. 2000; 38(2): 542-546.
18. Junior MAS, Ferreira ES, Conceição GC. Betalactamases de Espectro Ampliado (ESBL): um Importante Mecanismo de Resistência Bacteriana e sua Detecção no Laboratório Clínico. NewsLab. 2004; 63: 152-174.