

PESQUISA DE ANTIBACTERIANOS NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO *

Carmo Elias Andrade MELLES **
Ilka Maria Landgraf LEE **
Augusto E. TAUNAY **

RIALA6/586

MELLES, C.E.A.; LEE, I.M.L. & TAUNAY, A.E. — Pesquisa de antibacterianos no líquido cefalorraquidiano. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):155-159, 1984.

RESUMO: Tendo em vista que as dificuldades no diagnóstico laboratorial das meningites bacterianas poderiam estar ligadas a agentes antibacterianos presentes no líquido cefalorraquidiano (LCR), foi desenvolvida metodologia fácil para evidenciar a sua presença nesse material. Em placa de ágar Mueller Hinton, semeada com *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P não produtora de penicilinase e sensível a grande número de antibacterianos, foi colocado um molde metálico com orifícios nos quais se aplicou o LCR que se difundia impedindo ou não o crescimento da bactéria-padrão. Das 641 amostras de LCR estudadas, em 38,53% o antibacteriano estava presente, e em 60,53% das amostras o agente etiológico foi caracterizado por exames bacteriológicos e/ou imunológicos. Os restantes 39,47% foram considerados de etiologia indeterminada. Pela análise estatística pode-se concluir que a presença de antibacteriano no LCR prejudica sobremaneira o diagnóstico laboratorial das meningites bacterianas. Considerando que a técnica empregada é de fácil execução, o seu uso rotineiro contribuirá para melhor interpretação dos resultados, principalmente daquelas amostras de LCR purulento em que não se visualiza ou identifica o agente bacteriano.

DESCRIPTORIOS: substâncias antibacterianas, pesquisa no líquido cefalorraquidiano; meningite, diagnóstico bacteriológico; líquido cefalorraquidiano, pesquisa de substâncias antibacterianas.

INTRODUÇÃO

As dificuldades existentes para evidenciar as bactérias responsáveis pelas meningites purulentas são reconhecidas de longa data¹¹. Com o advento da quimioterapia antibacteriana, começou-se a discutir se a presença dessas substâncias no líquido cefalorraquidiano seria a responsável por grande número de casos em que a doença é rotulada como meningite de causa indeterminada^{2, 4, 8}.

A informação sobre a administração ou não de antibacterianos, antes da retirada do LCR, raramente é confiável¹⁰. Investigando o assunto, observamos que a identificação dos casos tratados antes da colheita do LCR foi baseada em revisões de prontuários clínicos^{6, 13, 14, 15, 16, 18}. Na literatura que consultamos, só encontramos duas referências sobre a pesquisa de antibacterianos no LCR. Em

uma, os autores¹⁷ mostram a permeabilidade das meninges à penicilina nas diferentes fases da doença e, na outra, estudam a influência do quimioterápico no resultado do exame laboratorial em pequeno número de casos.

Visando esclarecer este problema, desenvolvemos metodologia simples, de fácil emprego até em laboratórios de recursos médios, que permite informar a eventual presença ou ausência de antibacterianos no LCR.

MATERIAIS E MÉTODOS

No período de 2 anos, foram estudados 1.340 LCR de pacientes internados no Hospital "Emílio Ribas", São Paulo, com suspeita clínica de meningite, que foram enviados ao Instituto "Adolfo Lutz" para diagnóstico imunobacteriológico. Em todas as

* Realizado na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

amostras de LCR foi pesquisada a presença de antibacteriano; entretanto, só foi possível evidenciar alterações consideradas como indicativas de infecção bacteriana em 641 amostras. O critério adotado foi a positividade do exame bacteriológico ou a identificação de antígenos bacterianos demonstrados pela técnica da contraímunoelctroforese. Foram também incluídos os casos nos quais os exames acima citados foram negativos, mas estavam presentes alterações químico-citológicas, tais como o aumento do número de células por mm³ igual ou maior do de 1.000, ou então, a porcentagem de neutrófilos era de 60% ou mais, e a concentração de glicose e proteínas era 40 mg/ml ou menor, e 80 mg/ml ou maior, respectivamente. Qualquer variação marcante nas amostras de LCR, que sugerisse tratar-se de meningite bacteriana, foi incluída neste estudo.

Colheita e transporte do material

O LCR dos pacientes foi colhido por punção raquidiana lombar. Foi separado em duas alíquotas, uma para o exame bioquímico e citológico e outra encaminhada ao Instituto "Adolfo Lutz" para que se processassem provas de diagnóstico etiológico.

Recomendou-se que essa segunda alíquota tivesse pelo menos 2 ml; que fosse colhida em tubo de vidro esterilizado; conservada em estufa a 35-37°C, e enviada ao laboratório no menor espaço de tempo, se possível, entre 3 a 4 horas após a colheita.

Pesquisa de substâncias antibacterianas no líquido cefalorraquidiano

A metodologia para verificação da presença dos agentes antibacterianos no LCR foi baseada no método desenvolvido por GROVER & RANDAL⁹, em 1955. Na padronização da prova, esta técnica foi posteriormente modificada; empregou-se como bactéria-teste o *Staphylococcus aureus* ATCC Rockville MD 6538P, não produtor de penicilinase. Inicialmente, foi verificada a sensibilidade da cepa-padrão à ampicilina diluída em tampão fosfato, pH 6,0, em diferentes concentrações e padronizado o volume do LCR a ser aplicado em cada teste. De cada diluição da ampicilina foram utilizados os volumes de 0,2 e de 0,4 ml, feita em triplicata para cada volume. As concentrações do antibiótico nos volumes de 0,2 e 0,4 ml foram de 0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1,0 µg/ml, 1,5 µg/ml, 2,0 µg/ml e 2,5 µg/ml e 3,0 µg/ml. Os mesmos volumes também foram utilizados para uma amostra de LCR proveniente de um paciente que era sabido já ter feito uso do antibacteriano antes da punção.

A fim de verificar se a sensibilidade do estafilococo usado como padrão, não sofrera mudança aos diferentes antibacterianos, empregamos para o teste a técnica descrita por BAUER et alii³. Utilizamos discos de procedência DIFCO impregnados com ampicilina (10 µg), penicilina (10 U), tetraciclina

(30 µg), eritromicina (15 µg), kanamicina (30 µg), cloranfenicol (30 µg), estreptomina (10 µg), cefalosporina (30 µg), gentamicina (10 µg), novobiocina (30 µg), oxacilina (2µg), sulfametoxazol-trimethopim (25 µg). Tal prova foi repetida algumas vezes durante a pesquisa, não tendo sido verificada nenhuma variação da sensibilidade da cepa-padrão em relação aos mesmos agentes antibacterianos.

Na pesquisa de antibacterianos no LCR, a cepa-padrão de *Staphylococcus aureus* foi semeada em placa contendo ágar Mueller Hinton, obedecendo à técnica de estrias a fim de se obterem colônias isoladas, da qual, 18-24 horas após a incubação a 35-37°C, tomamos 5 colônias separadas, que foram semeadas em tubo contendo quantidade conhecida de caldo comum. Do crescimento obtido após incubação, foi feita a diluição de 100 vezes em outro caldo de volume conhecido e semeada por inunção em outra placa contendo ágar Mueller Hinton, retirando-se o excesso da suspensão bacteriana com pipeta Pasteur. A preparação foi deixada em estufa a 37°C por 15 min e, a seguir, um "molde" de metal contendo 6 orifícios de 5 mm de diâmetro (figura 1), foi colocado sobre a superfície devidamente semeada.

Em cada um dos orifícios com pipeta volumétrica depositou-se 0,2 ml de LCR, de modo a se difundir lentamente no ágar. A prova foi feita o mais precocemente possível, evitando que o LCR permanecesse por longo tempo à temperatura ambiente, o que poderia ocasionar a degradação do quimioterápico. As placas assim preparadas foram incubadas a 35-37°C por um período de 18-24 horas. A leitura da prova foi feita retirando o molde metálico e medindo, quando presente, o halo de inibição do crescimento bacteriano com régua milimetrada, (figuras 2 e 3). Sempre que possível, esta prova era feita em duplicata. Foi considerado LCR com antibiótico ou quimioterápico presente aquele em que o halo de inibição do crescimento bacteriano foi de 10 mm de diâmetro ou maior, e antibiótico ausente, quando não houve inibição.

RESULTADO

As diferentes concentrações da ampicilina empregada na padronização do método, nos volumes de 0,2 ou 0,4 ml resultaram em média, em diâmetros do halo de inibição do crescimento bacteriano de 10; 12; 16; 21; 23; 23,3 e 24,2 mm segundo maior ou menor concentração. O mesmo procedimento, feito com um LCR cujo paciente sabidamente fez uso de quimioterápico, não demonstrou variação significativa quando se usou o volume de 0,2 ou 0,4 ml para aplicação do teste.

Aplicada a metodologia descrita na pesquisa de antibacterianos no LCR, observou-se que, de 641 amostras com características de meningite purulenta, em 38,53% foi detectado

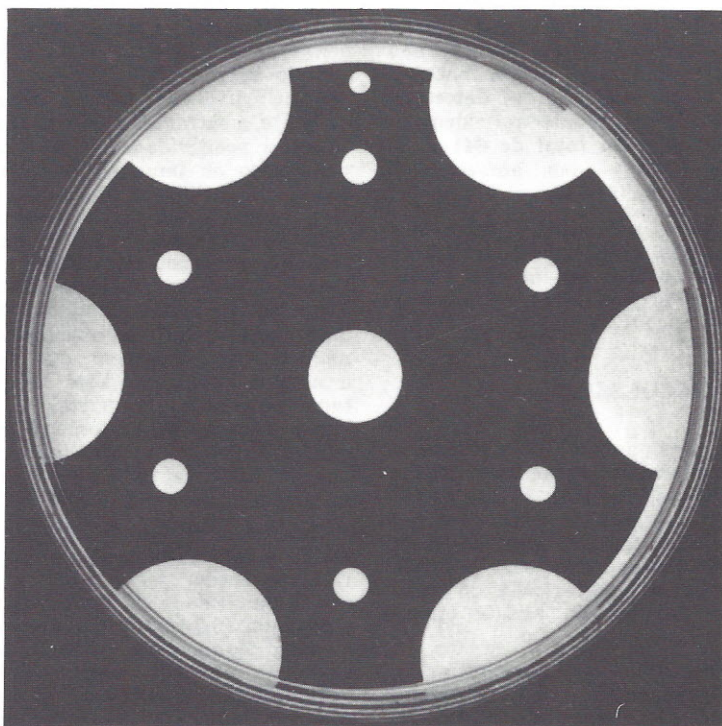
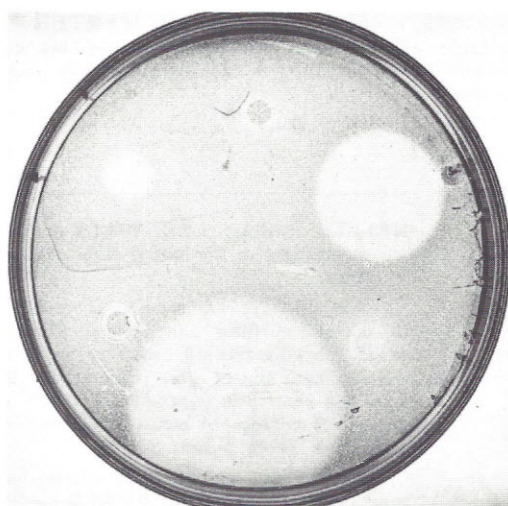
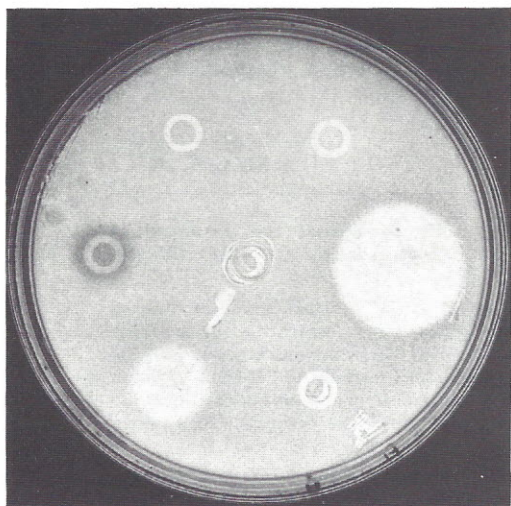


FIGURA 1 — Molde metálico utilizado para realização do teste.



FIGURAS 2 e 3 — Halos de inibição do crescimento bacteriano.

antibacteriano. Nestas, 51,01%, mesmo na presença de antibiótico, foi possível identificar o agente etiológico e, em 48,99% não foi possível determinar a etiologia bacteriana. Nas amostras em que não foi detectado antibiótico (61,47%), o agente foi identificado em 66,50% delas. Do total de 641 LCR examinados, em 60,53% das amostras o agente etiológico foi esclarecido.

Aplicando o teste unicaudal, dentro dos parâmetros escolhidos, verificou-se que quanto menor o diâmetro do halo de inibição bacteriana, maior foi a probabilidade de identificar o agente etiológico ($Z = -1,73 \quad = 0,05$).

DISCUSSÃO

Apesar de alguns autores^{4,5} preconizarem a pesquisa de substâncias antibacterianas em líquidos biológicos, somente FELDMAN⁷, 1977, pesquisou a presença de antibacteriano em número limitado de amostras de LCR de indivíduos em tratamento; sua intenção foi a de relacionar a interferência do antibacteriano no diagnóstico do agente etiológico.

A análise dos resultados por nós obtidos na pesquisa de antibacterianos no LCR mostrou que, das amostras examinadas, em 38,53% foi detectada a presença desses agentes. Na literatura consultada, os dados de alguns autores^{10, 12, 13}, relacionados ao assunto, têm como base somente levantamentos retrospectivos de prontuários de casos suspeitos de meningites. Por esta razão, na realidade não podem ser comparáveis aos nossos, quando procuramos o antibacteriano no LCR. Seria também interessante, entre outros, o conhecimento da via utilizada na aplicação do antibacteriano, a duração e a efetiva penetração deste agente através da barreira líquórica. Estas informações são de difícil obtenção, o que é comentado por HARTER¹⁰, quando afirma que dados sobre um tratamento prévio à internação nem sempre são corretos.

A avaliação estatística dos nossos resultados demonstra haver associação entre a presença de antibiótico no LCR e a identificação do agente etiológico, ou seja, a presença de antibiótico no LCR diminuiu significativamente a caracterização da bactéria. Entretanto, a positividade de um exame, seja bacteriológico ou imunológico, não exclui a presença de antibiótico no LCR, principalmente se a bactéria não for sensível ao mesmo. Tal fato foi constatado no presente trabalho; contudo, observou-se, também, que a concentração do agente antibacteriano (medida pelo diâmetro do halo de inibição do crescimento bacteriano) foi significativamente menor naquelas amostras em que foi identificado o agente etiológico. Este resultado apresentado contradiz, em parte, a afirmativa de que a duração do tratamento preliminar não parece influenciar nos achados clínicos ou nos do LCR de forma a prejudicar o reconhecimento de uma meningite bacteriana¹⁰.

Considerando que a demonstração da presença de antibacteriano no LCR é prova de fácil execução, segundo a técnica descrita; que a quantidade de LCR utilizada na prova é pequena (0,2 ml), e que durante toda a pesquisa a cepa-padrão utilizada não apresentou variações em sua sensibilidade aos vários antibacterianos testados, é que recomendamos sua aplicação na rotina pois traria contribuição de valor na interpretação dos resultados do exame bacteriológico e imunológico de líquido cefalorraquidiano.

A razão de recomendarmos a pesquisa de antibacterianos no LCR é porque esta vem elucidar os inúmeros casos de LCR purulentos onde, pela bacterioscopia, se visualizam corpos bacterianos dos quais não há crescimento nos meios de cultura habituais, ou onde são vistas "imagens" semelhantes a bactérias, porém com morfologia tão alterada que não permite uma conclusão diagnóstica. Da mesma forma, estes corpos não são capazes de se multiplicar nos meios de cultura de escolha para o diagnóstico bacteriológico das meningites.

RIALA6/586

MELLES, C.E.A.; LEE, I.M.L. & TAUNAY, A.E. — Search for antibacterial substances in the spinal fluid of patients. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(2):155-159, 1984.

ABSTRACT: A simple procedure for detection of antibacterial substances in the spinal fluid was devised. The aim was disclosing to which extent antibacterial substances could interfere with the diagnosis of bacterial meningites. Müller-Hinton agar plates were inoculated with *Staphylococcus aureus* ATCC-6538 P which is a non-penicillinase-producing strain and is sensitive to many antibacterial substances. A perforated metal model received the spinal fluid, the occurrence or absence of growth being noted.

Out of 641 spinal fluid specimens, 38,53% showed presence of antibacterial substances. In 60,53% of the LCR studied, a bacteria was identified bacteriologically and/or immunologically.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AURELI, G.; CURCIO, L.; PALMINTERI, R. & RIGOLI, E. — Determinazione dell'attività antibiotica residua nel liquor. *Ann. Slavo*, 19:750-7, 1977.
2. BASTOS, C.O.; TAUNAY, A.E.; GALVÃO, P.A.A.; TIRIBA, A.C.; SARAIVA, P.A.; CASTRO, I.O. & LOMAR, A.V. — Meningitis: considerações sobre 15.607 casos internados no Hospital "Emílio Ribas" durante o quinquênio 1958-1972. Ocorrência etiológica e letalidade. *Rev. Assoc. méd. bras.*, 19:451-6, 1973.
3. BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C. & TURCK, M. — Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Amer. J. Clin. Path.*, 36:493-6, 1966.
4. CARVALHO, E.S.; NISKIER, H.; PESSÔA, G.V.A.; CARVALHO, L.H.F.R. & FAREHAT, K.C. — Incidência das meningites bacterianas. *Clin. Geral*, São Paulo, 12:23-5, 1978.
5. CHABBERT, Y.A. — Le laboratoire d'antibiothérapie dans les meningites purulentes. *Sem. Hôsp. Paris*, 43:239-42, 1967.
6. FEIGIN, R.D. & DODGE, P.R. — Bacterial meningitidis: newer concepts of pathophysiology and neurologic sequelae. *Pediatr. clin. N. Amer.*, 23:541-55, 1976.
7. FELDMAN, W.E. — Effect of prior antibiotic therapy on concentrations of bacteria in CSF. *Amer. J. Dis. Child.*, 132:672-44, 1977.
8. FINLAND, M. & BARNES, M.W. — Acute bacterial meningitis at Boston City Hospital during 12 selected years, 1935-1972. *J. infect. Dis.*, 136:400-15, 1977.
9. GROVE, D.C. & RANDAL, W.A. — Assay methods of antibiotic. A laboratory manual. New York, Medical Encyclopedia, c1955.
10. HARTER, D.H. — Preliminary antibiotic therapy in bacterial meningitis. *Arch. Neurol.*, 9:343-7, 1963.
11. HEDRICH, A.W. — The movements of epidemic meningitis, 1915-1930. *Public Health Rep.*, 46:2709-26, 1931.
12. HODGES, G.R. — Acute bacterial meningitis: an analysis of factors influencing prognosis. *Amer. J. med. Sci.*, 270:427-40, 1975.
13. JARVIS, C.W. & SAXENA, K.M. — Does prior antibiotic treatment hamper the diagnosis of acute bacterial meningitis? An analysis of a series of 135 childhood cases. *Clin. Pediatr.*, 11:201-4, 1972.
14. JONES, R.G. — Bacterial meningitis. Part I. Incidence and diagnosis. *S. Afr. med. J.*, 41:75-9, 1967.
15. LOPES, A.F.; FLEISCHER, G. & ZULIANI, A. — Meningite. Estudo retrospectivo dos casos internados na enfermaria do Departamento de Pediatria da FCMBB em 1973 e 1974. *J. Pediatr.*, 40:165-70, 1975.
16. MANDAL, B.K. — The dilemma of partially treated bacterial meningitis. *Scand. J. infect. Dis.*, 8:185-8, 1976.
17. SCATENA, L.; BARRACHINI, O.; ITO, I.Y.; ALMEIDA, S.A.R. — Meningite meningocócica. Níveis de ampicilina no líquido cefalorraquidiano e no soro. *J. Pediatr.*, 40:149-52, 1952.
18. UNDERMAN, A.E.; OVERTURF, G.O. & LEEDON, J.M. — Bacterial meningitis. *D.M.*, 24:1-63, 1978.

Recebido para publicação em 14 de março de 1984.

