

ESTUDO COMPARATIVO DOS SISTEMAS BACT/ALERT E HEMOBAC TRIFÁSICO PARA A REALIZAÇÃO DE HEMOCULTURAS.

SEPAC Medicina Laboratorial - Edgar Garcez Junior e Álvaro Rodrigues Martins

Resumo

A hemocultura é sem dúvida uma das mais importantes tarefas dos laboratórios de microbiologia clínica. Avaliamos neste estudo dois sistemas diferentes para a realização das mesmas em relação ao tempo decorrido para a positividade do indicador de CO₂ e a presença de colônias viáveis para identificação e realização do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos. Nos 193 pares de hemocultura analisados, onde após a coleta o sangue foi igualmente distribuído entre um frasco de Bact/Alert FAN® (BA) (bioMérieux, França) e outro de Hemobac Trifásico® (HT) (Probac do Brasil) obtivemos positividade total de 20,2% (n=39) BA e 20,7% (n=40) HT. A média de tempo para positividade do indicador de CO₂ foi de 27,2 horas BA e 30,8 horas HT (ns), para disponibilidade de colônias viáveis foi de 40,2 horas BA e 31,7 horas HT (p<0,05) e o tempo total decorrido até a liberação da identificação e TSA foi de 56,5 horas BA e 48,6 horas HT (ns). Foram isolados: S.aureus (n=20), E.cloacae (n=5), K.pneumoniae (n=4), P.fluorescens (n=3), C.albicans (n=3), S.marcescens (n=2), S.pneumoniae (n=1), E.coli (n=1) e K.oxytoca (n=1). Estes dados sugerem que os sistemas analisados apresentam desempenhos semelhantes, onde HT mostra disponibilizar precocemente colônias viáveis para a rotina microbiológica.

Objetivos

Avaliar o desempenho de dois sistemas disponíveis para realização de hemoculturas em relação à detecção microbiana, tempo para positividade do indicador de CO₂ e presença de colônias viáveis para identificação e realização do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (TSA).

Casística e Métodos

Técnicos de laboratório treinados obtiveram aproximadamente 20 ml de sangue coletado de punções periféricas assepticamente realizadas de pacientes com suspeita de bacteremia de todos os departamentos do Hospital e Maternidade Assunção em São Bernardo do Campo - São Paulo. Este sangue foi distribuído em partes iguais para um frasco de Bact/Alert FAN® e outro de Hemobac Trifásico® que eram então encaminhados para o laboratório de microbiologia para receber o devido processamento.

Após o recebimento, as amostras dos frascos Bact/Alert eram colocadas no módulo estufa do fabricante conforme suas recomendações, o monitoramento contínuo da produção de CO₂ era iniciado e assim que positividade fosse indicada pelo aparelho o material era semeado em placas de agar sangue e chocolate, seja no expediente diurno ou no período de plantão noturno do laboratório. Já os frascos de HT eram invertidos de modo a semear os meios de cultura acoplados assim que recebidos e colocados em estufa que agitava constantemente os frascos e realizava nova inversão dos mesmos a cada 12 horas.

Os frascos de Hemobac Trifásico foram lidos juntamente com as placas semeadas a partir dos frascos de Bact/Alert indicados como positivos, durante o expediente diurno do laboratório em três horários diferentes em busca de viragem do indicador de CO₂ (mudança de cor no HT) ou aparecimento de colônias bacterianas sobre os meios de cultura sólidos. Frente à presença de colônias originadas de qualquer dos sistemas, era realizada a identificação bacteriana e teste de sensibilidade aos antimicrobianos.

Quando da viragem apenas do indicador foi realizada bacterioscopia direta do caldo do sentido de informar precocemente um resultado parcial e aguardado o crescimento bacteriano sobre as faces do laminocultivo, ou meios de cultura tradicionais, no caso dos frascos Bact/Alert.

Os sistemas foram acompanhados por cinco dias sendo que, não havendo indicação de positividade pelo equipamento nos frascos BA e viragem do indicador e/ou aparecimento de colônias bacterianas no HT que foi mantido e observado em estufa sem inversão até o 7º dia de incubação, ambos eram então cuidadosamente descartados e considerados como negativos.

Do término do 3º dia, havendo positividade em qualquer um dos sistemas que não tivesse sido diagnosticado pelo outro, uma cultura final através da semeadura do caldo em uma placa de agar chocolate também era realizada e analisada após 48 horas de incubação.

Para a análise estatística foi utilizado o software EpiInfo 6.0 (WHO/CDC - World Health Organization e Centers for Diseases Control and Prevention) e valores de p<0,05 foram considerados significativos.

Resultados

Dos 193 pares de hemoculturas compostos de um frasco Bact/alert FAN® e de outro Hemobac Trifásico® recebidos houve crescimento em 20,7% dos pares analisados (n=40). Não houve nenhum crescimento exclusivo no Bact/Alert e, em apenas um caso (0,5%) exclusivamente no Hemobac Trifásico, como podemos observar na tabela 1.

Tabela 1: Número de isolamentos segundo os diferentes sistemas avaliados conforme as espécies bacterianas.

Microorganismo (número isolados)	Número de isolados detectados por:		
	Ambos sistemas	Bact/Alert Semente	Hemobac Trifásico semente
Staphylococcus aureus (n=20) ^a	19	-	1
Enterobacter cloacae (n=5)	5	-	-
Klebsiella pneumoniae (n=4)	4	-	-
Pseudomonas fluorescens (n=3)	3	-	-
Candida albicans (n=3)	3	-	-
Serratia marcescens (n=2)	2	-	-
S. pneumoniae (n=1)	1	-	-
Escherichia coli (n=1)	1	-	-
Klebsiella oxytoca (n=1)	1	-	-
Todos isolados (n=40)	39	-	1

Em relação à precocidade na detecção da produção de CO₂ entre os métodos obtivemos os resultados observados na tabela 3, onde 20% (n=8) foram detectados com pelo menos 12 horas de antecedência pelo Bact/Alert em relação ao Hemobac Trifásico que, por sua vez apresentou 12,5% (n=5) dos casos sendo detectados com pelo menos 12 horas de antecedência em relação à outra metodologia.

Finalmente com relação à viabilidade de colônias isoladas para identificação e teste de sensibilidade temos que a média pelo Bact/Alert através do aparelho indicando positividade acrescido do tempo para aparecimento de colônias nas placas semeadas foi de 40,2 horas enquanto que no Hemobac Trifásico foi de 31,7 horas (p<0,05), observar na tabela 4.

Tabela 2: Tempo médio para positividade do indicador de CO₂ nas metodologias analisadas segundo o microrganismo isolado.

Microorganismo (número isolados)	Média de positividade indicador CO ₂ (horas)		Valor p ^b
	BA	HT	
Staphylococcus aureus (n=20) ^a	28,3	34,2	0,35 (ns)
Enterobacter cloacae (n=5)	21,2	25,6	0,63 (ns)
Klebsiella pneumoniae (n=4)	26,0	35,7	0,56 (ns)
Pseudomonas fluorescens (n=3)	22,6	18,3	0,68 (ns)
Candida albicans (n=3)	47,3	40,0	0,75 (ns)
Serratia marcescens (n=2)	14,5	13,0	0,79 (ns)
S. pneumoniae (n=1)	28,0	32,0	na
Escherichia coli (n=1)	30,0	28,0	na
Klebsiella oxytoca (n=1)	16,0	18,0	na
Todos isolados (n=40)	27,2	30,8	0,38 (ns)

^a Não houve o isolamento de um caso de S. aureus pelo Bact/Alert.
^b ns, não significante (p>0,05)
^c na, não aplicável

Tabela 3: Comparação dos tempos necessários para a positividade do indicador nos microrganismos analisados pelo Bact/Alert e Hemobac Trifásico.

Microorganismo (número isolados)	Precocidade positividade indicador nas duas metodologias analisadas:		
	BA e HT (mesmo tempo) ^a	BA ≥ 12 horas antecedência	HT ≥ 12 horas antecedência
Staphylococcus aureus (n=20) ^a	13	5	2
Enterobacter cloacae (n=5)	2	2	1
Klebsiella pneumoniae (n=4)	3	1	-
Pseudomonas fluorescens (n=3)	2	-	1
Candida albicans (n=3)	3	-	-
Serratia marcescens (n=2)	1	-	1
S. pneumoniae (n=1)	1	-	-
Escherichia coli (n=1)	1	-	-
Klebsiella oxytoca (n=1)	1	-	-
Todos isolados (n=40)	27 (67,5%)	8 (20%)	5 (12,5%)

^a Não houve o isolamento de um caso de S. aureus pelo Bact/Alert.
^b Mesmo tempo: até 12 horas de diferença na positividade entre as duas metodologias

Em relação à precocidade na detecção de colônias bacterianas entre os métodos obtivemos os resultados observados na tabela 5, onde 7,5% (n=3) foram detectados com pelo menos 12 horas de antecedência pelo Bact/Alert em relação ao Hemobac Trifásico enquanto que este, por sua vez mostrou 52,5% (n=21) dos casos sendo detectados com pelo menos 12 horas de antecedência em relação à outra metodologia.

Tabela 5: Comparação dos tempos necessários para a obtenção de colônias bacterianas segundo os microrganismos analisados pelo Bact/Alert e Hemobac Trifásico.

Microorganismo (número isolados)	Precocidade isolamento de colônias bacterianas nas duas metodologias analisadas:		
	BA e HT (mesmo tempo) ^a	BA ≥ 12 horas antecedência	HT ≥ 12 horas antecedência
Staphylococcus aureus (n=20) ^a	9	2	9
Enterobacter cloacae (n=5)	4	-	1
Klebsiella pneumoniae (n=4)	1	1	2
Pseudomonas fluorescens (n=3)	1	-	2
Candida albicans (n=3)	-	-	3
Serratia marcescens (n=2)	1	-	1
S. pneumoniae (n=1)	-	-	1
Escherichia coli (n=1)	-	-	1
Klebsiella oxytoca (n=1)	-	-	1
Todos isolados (n=40)	16 (40,0%)	3 (7,5%)	21 (52,5%)

^a Não houve o isolamento de um caso de S. aureus pelo Bact/Alert.
^b Mesmo tempo: até 12 horas de diferença na positividade entre as duas metodologias

Considerando o tempo decorrido até a liberação da identificação e teste de susceptibilidade aos antimicrobianos temos que o tempo médio obtido para o Bact/Alert foi de 56,5 horas e de 48,0 horas para o Hemobac Trifásico (ns).

Não foram encontrados falso-negativos no Bact/Alert em relação ao Hemobac Trifásico e vice-versa com a metodologia adotada.

Discussão

Neste estudo não houve diferença estatística significativa no número de isolamentos obtidos pelos Sistemas Bact/Alert e Hemobac Trifásico. Deve ser notada que a comparação foi realizada com frascos de Bact/Alert FAN® - que contém agentes para neutralizar antibióticos onde, no entanto, não foi notado maior número de isolamentos, mesmo com 32,1% (n=62) dos pacientes fazendo uso de antibióticos no momento da coleta.

Provavelmente, a maior diluição do sangue nos frascos de Hemobac Trifásico, que contem um volume maior de caldo de cultivo que o outro sistema avaliado acabaria diluindo mais os prováveis agentes inibidores do crescimento bacteriano, diminuindo também sua atividade antimicrobiana diretamente através da menor concentração de antimicrobianos que acaba ficando presente neste sistema. Mais ainda, temos que a semeadura dos laminocultivos pela inversão do Hemobac Trifásico pode fazer com que as bactérias desenvolvam-se nas lâminas de agar independentemente do antibiótico presente no caldo (ROHNER *et. al.*, 1996).

Outra vantagem observada no Hemobac Trifásico foi a não necessidade de punção dos frascos positivos para semeadura em placa, evitando-se assim risco de contaminação da amostra e do manipulador, diminuição dos custos de bancada pela não necessidade da utilização de agulhas, seringas e placas com meios sólidos de cultivo para isolamento bacteriano e menor utilização de mão-de-obra.

O Bact/Alert detectou patógenos, através de seu indicador de CO₂, mais rapidamente que no Hemobac Trifásico, apesar de não haver na amostra estudada diferença estatística significativa, onde a monitorização contínua deste sistema permite esta vantagem. Entretanto, a presença de colônias nas lâminas de agar do Sistema Hemobac Trifásico de maneira mais rápida que as obtidas no outro sistema avaliado (p<0,05) favorece uma determinação mais rápida da identificação bacteriana.

Estudos anteriores já demonstraram a superioridade de um sistema bifásico manual disponível no mercado, que não tem o indicador de CO₂ em sua composição em relação a outra metodologia automatizada também bastante difundida em nosso meio, onde a presença de colônias isoladas no laminocultivo, mesmo apesar de ter havido uma indicação de positividade precoce no sistema automatizado analisado através do CO₂, teve no sistema bifásico uma vantagem estatisticamente significante de uma identificação microbiológica e realização do teste de sensibilidade aos antimicrobianos de forma mais rápida pela presença de colônias isoladas de forma precoce, o que no ambiente hospitalar é um dos maiores objetivos na realização de uma hemocultura. (ROHNER *et. al.*, 1996)

Temos ainda que a diferença mostrada acima pode ficar ainda mais evidente se aplicarmos aos laboratórios de microbiologia que utilizam metodologias automatizadas e que não possuem plantão noturno, onde havendo indicação de positividade pelo aparelho neste período, sua semeadura será atrasada e o diagnóstico através de colônias poderá ficar ainda mais comprometido, podendo este tempo ser aumentado em até mesmo 12 horas, já que a semeadura deste caldo só seria realizada no próximo expediente laboratorial, o que não aconteceria com o sistema Hemobac Trifásico avaliado em nosso trabalho.

Apesar de ambos, Bact/Alert e Hemobac Trifásico, permitirem cultura para bactérias anaeróbias estritas, tal procedimento somente é realizado em nosso serviço quando individualmente solicitado pela equipe médica, fazendo com que os mesmos não pudessem ser comparativamente avaliados nesta oportunidade.

Conclusão

Com tudo isso temos que Hemobac Trifásico mostra ser uma alternativa efetiva no diagnóstico microbiológico em relação ao Bact/Alert, com a vantagem do custo e da produção nacional, além do menor processamento laboratorial em relação aos métodos manuais, mantendo boa correlação custo-efetividade para laboratórios que processam diferentes quantidades de hemoculturas.

Referências Bibliográficas:

- COCKERILL, F. *et. al.* Clinical comparison of Dilco ESP Wampole Isolator and Becton Dickinson Seppli-Chek aerobic blood culturing systems. *Journal of Clinical Microbiology*, 34:20-24, 1996.
- WAIN-COOPER, F. *et. al.* Initial concentration of Staphylococcus epidemiae in simulated pediatric blood culture correlates with time to positive results with the automated continuously monitored BACTEC blood culture system. *Journal of Clinical Microbiology*, 40:898-901, 2002.
- WIKELLY, B. *et. al.* Controlled clinical comparison of two lysin-based blood culture systems, Isolator and Seppli-Chek Release, for detection of bloodstream infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 31:2114-2117, 1993.
- KLERNER, HG *et. al.* Failure on an automated blood culture system to detect nonfermentative Gram-negative bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 38:1036-1041, 2000.
- KONEMAN, Elmer *et. al.* *Diagnostico Microbiologico: Texto atlas atlas, 5ª ed.* Editora Panamericana, 1999.
- POKLMAN, JK *et. al.* Controlled clinical evaluation of BACTEC Plus Aerobic/F and Bact/Alert Aerobic FAN bottles for detection of bloodstream infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 33:2856-2858, 1995.
- ROHNER, P. *et. al.* Comparative evaluation of BACTEC Aerobic Plus/F and Seppli-Chek release blood culture media. *Journal of Clinical Microbiology*, 34:1261-129, 1996.
- WEINSTEIN, MP *et. al.* Controlled evaluation of Bact/Alert standard aerobic and FAN aerobic blood culture bottles for detection of bacteremia and fungemia. *Journal of Clinical Microbiology*, 33:879-882, 1995.

Agradecimentos: Os autores agradecemos a Probac do Brasil pelo fornecimento dos frascos de Hemobac Trifásico® necessários para a realização deste estudo.