

HEMOCULTURA EM PORTADORES DE ENDOCARDITE INFECCIOSA. NORMAS ATUAIS E NOSSA EXPERIÊNCIA

CAIO MÁRCIO F. MENDES, LUIZ V. DÉCOURT, MAX GRINBERG

Como é sabido, em diferentes processos mórbidos germes penetram na corrente sangüínea por diferentes vias, a partir de zonas infectadas extravasculares. Sua entrada direta ocorre em determinadas infecções intravasculares, assim em fistulas artério-venosas, em flebites supuradas, em casos de uso e cateteres intravenosos contaminados e particularmente na endocardite infecciosa (EI).

O reconhecimento de microorganismos no sangue de paciente portador desta afecção é, então, uma necessidade, não só para diagnóstico, como para prognóstico e orientação terapêutica.

A preocupação com técnicas adequadas de hemocultura é uma constante, sempre atual em revisões expressivas e informadoras^{1,2} e em análise de métodos diagnósticos³.

Neste trabalho serão expostos os princípios que orientam nossas atividades na Secção de Microbiologia do Laboratório Central do Hospital das Clínicas, em íntima associação com a assistência a enfermos no Instituto do Coração. A experiência atual fundamenta-se no estudo de 300 portadores de endocardite infecciosa submetidos a hemoculturas.

Técnica na colheita do material

Admitimos sempre a necessidade de rigorosa antissepsia no local da punção para coleta de sangue, no sentido de evitar-se contaminação dos meios de cultura por germes habituais da pele. Em geral, são utilizados agentes bactericidas simples, como álcool isopropílico a 70%, sucedido por emprego de tintura de iodo a 2% ou de iodo-povidone a 10%, aplicados de forma concêntrica em volta do local apropriado. Após a retirada de sangue, o iodo residual pode ser removido com esponja de álcool. O mesmo cuidado deve ser tomado com a tampa do frasco do meio de hemocultura, onde o material será inoculado. É recomendável, também, a troca da agulha utilizada na punção do enfermo por outra, estéril, antes da introdução da amostra nos frascos de cultura. O sangue coletado deverá ser imediatamente inoculado nestes meios.

Apesar desses cuidados, deve-se ter em mente a possibilidade de hemoculturas falsamente positivas,

que ocorrem em certas ocasiões. Esta situação será discutida adiante. Já se constataram casos de contaminação da própria solução antisséptica por bactérias não habituais, como a *Pseudomonas cepacia*⁴. É evidente, pois, que qualquer microorganismo isolado na cultura deverá ser adequadamente avaliado, em relação aos dados clínicos e, em particular, em sua recorrência em outras amostras.

Volume de sangue a ser coletado

Os sistemas disponíveis para obtenção de hemoculturas são geralmente constituídos por frascos contendo quantidades variáveis de meios apropriados.

A maior parte das bacteriemias na E.I. é de baixa magnitude, oscilando de menos que 5 a mais de 300 germes/ml de sangue, com incidência habitual de cerca de 30/ml de sangue⁵. Por outra, o soro humano fresco a concentrações de 50% ou mais possui rápida ação bactericida. Desta forma, como norma geral, a quantidade de sangue a ser coletada e inoculada nos frascos deve corresponder a cerca de 10% do volume do caldo de cultura. Alguns estudos têm demonstrado que volumes de até 15% em relação à quantidade de caldo podem ser mais informadoras, obtendo-se, eventualmente, real aumento da positividade⁶⁻⁸. Volumes maiores de sangue, entretanto, podem inibir o crescimento bacteriano.

Em nosso laboratório, utilizamos método radio-métrico com aparelho Bactec 460 (Johnston Laboratories, Cockeysville, MD, U.S.A.), no qual são utilizados frascos Bactec 6B e 7D, respectivamente para aeróbios e para anaeróbios. A quantidade de meio de cultura nestes frascos é de 30 ml, de modo que neles inoculamos cerca de 3 a 4 ml de sangue.

Para crianças, em culturas de rotina, são em geral satisfatórios os volumes de 1 a 5 ml sangue⁹. Deve ser lembrado que, particularmente em recém-nascidos, a concentração sangüínea de microorganismos é, de hábito, superior à observada em adultos.

Sequência na obtenção de amostras

O número de amostras e o intervalo entre elas podem ser avaliadas, em função de nossos conheci-

mentos sobre a fisiopatogenia da bacteriemia. Nas endocardites infecciosas e em outras infecções intravasculares, esta é praticamente contínua, desde que os germes são semeados constantemente no sangue a partir das vegetações¹⁰. Devemos, portanto, colher de duas a quatro amostras em período de 24 horas, sendo, em geral, desnecessárias coletas mais numerosas. Em determinadas situações de emergência, hemoculturas podem ser obtidas até com intervalos de 10 a 20 minutos.

Em eventualidades de previsão, razoável, do momento de máxima hipertermia, amostras devem ser colhidas cerca de 40 a 60 minutos antes de sua ocorrência, desde que bacteriemias clinicamente significantes (intermitências possíveis mesmo perante sua presença constante) tornam-se presentes nessa fase¹¹. No momento do pico de febre o sangue pode ser quase estéril.

Em nossa experiência, quando de hemoculturas positivas, o número de amostras necessárias para diagnóstico tem sido pequeno. Em cerca de 90% dos casos temos obtido positividade nas duas primeiras delas. Em ocorrência de endocardites por bactérias do gênero *Streptococcus* a positividade é algo mais elevada, atingindo cerca de 95%.

Um fator que, reconhecidamente, pode comprometer o exame é o uso de agentes antimicrobianos até duas semanas antes da coleta de sangue. Nessa situação, utilizamos de rotina o sistema Bactec, com frascos de cultura 16B e 17D, que contêm resinas neutralizadoras da ação desses agentes. Na eventualidade de uso prévio de antibióticos beta-lactâmicos, devemos adicionar uma beta-lactamase, a penicilinase, para inativação da droga. Estamos de acordo com a necessidade de testes periódicos da penicilinase⁵ para afastar-se a ocorrência de falsas culturas positivas devido à contaminação da preparação enzimática.

Em determinados casos, mesmo sem o recurso destas técnicas laboratoriais, temos obtido crescimento bacteriano, porém significativamente mais lento que o habitual, conforme já também evidenciado por outros¹². Nestas situações, é conveniente que o laboratório de microbiologia realize verificações diárias por duas semanas, quando só então os frascos deverão ser desprezados.

Embora se reconheça hoje certa arbitrariedade na distinção entre formas "agudas" e "subagudas" de endocardite, algumas normas podem ser úteis. Nas primeiras, obtemos três hemoculturas no primeiro dia, dentro do prazo de uma a duas horas, e, sempre que possível, através de diferentes locais de punção. Caso elas se mostrem negativas depois de 48 horas, nova coleta de duas amostras deverá ser efetuada, sendo estas inoculadas em frascos especiais com resina. Nas habituais formas subagudas obtemos, também, cerca de três hemoculturas no primeiro dia; se estas resultarem negativas após 24 horas, devemos repeti-las (três amostras), sendo uma delas realizadas em meio hipertônico e outras duas em frascos com resina.

Uma possibilidade que deve ser ressaltada é a de crescimento mais lento de determinados germes por

suas características intrínsecas (*Brucella*, *Haemophilus*), o que aconselha a manutenção eventual de culturas por períodos de três a quatro semanas.

Tipos de meio de cultura

É sabido que meios de cultura com diferentes composições se encontram disponíveis no comércio e, também, que alguns deles podem ser preparados nos próprios laboratórios de microbiologia. Não há dúvida que em quaisquer condições, e em particular em casos de portadores de EI, cabe a esses laboratórios a seleção de caldos que apresentem melhores condições para sucesso no isolamento bacteriano, ou seja, dos que contenham suplementos necessários para o desenvolvimento de cepas exigentes, não facilmente reconhecíveis.

No momento, os meios mais utilizados de rotina são os seguintes: "Trypticase soy broth", "Brian heart infusion broth", caldo peptonado, caldo Columbia e caldo Brucella. Outros, como o Tioglicolato e o caldo Thiol são inibidores para determinadas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e para algumas leveduras⁷. A fungemia presente em enfermos com EI produzida por *Candida* pode não ser contínua, de modo que, muitas vezes, várias hemoculturas são necessárias.

Atualmente, todos os meios de cultura do comércio são suplementados por polianetolsulfonato de sódio (SPS) a 0,05%. Este é um anticoagulante sintético polianiónico, anticomplementar e antifagocítico; precipita beta-lipoproteínas, fibrinogênio, C₃, C₄, e IgG. Inativa concentrações médias de antibióticos do tipo de aminoglicosídeos e de poliximinas¹³⁻¹⁵. Inibe, portanto, substâncias bacterianas séricas¹³, incluindo o complemento e anticorpos e deprime a fagocitose que pode ocorrer no sangue da cultura¹⁶. Desta forma, favorece a recuperação de bactérias¹⁷. A importância desses diversos mecanismos ainda não foi determinada, não sendo improvável uma ação múltipla, embora variável, mas a atuação do anticoagulante é evidente. A discreta turvação do meio exige apenas maior atenção ao exame visual.

O SPS tem se apresentado como acessório fundamental para aumento da percentagem de isolamento de bactérias, embora se saiba que, às vezes, se comporta como agente inibidor para algumas cepas de *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Gardnerella vaginalis*, e *Peptostreptococcus anuerobins*. Este pode ser neutralizado por adição de gelatina a 1,2%¹⁸⁻²⁰, que parece não possuir efeito prejudicial sobre a detecção de outros microorganismos¹⁸.

Os frascos Bactec já contêm, além dos suplementos mencionados, hemina, vitamina K, piridoxina (vitamina B₆) e sacarose. Atualmente, a metodologia Bactec é das mais indicadas para uso de rotina, pois, ao lado da excelente qualidade dos meios de cultura, proporciona maior rapidez na detecção de microorganismos. Esta deve-se ao fato de que os substratos marcados com carbono 14, quando metabolizados por microorganismos presentes, liberam CO₂ marcado com

esse carbono, então detectado pelo aparelho Bactec 460. Ele está capacitado a realizar 60 hemoculturas em período de uma hora.

Com o emprego dessa metodologia dispomos também de uma variedade de meios com diferentes composições, para culturas de bactérias aeróbias e anaeróbias. E, ainda, de frascos com meios hipertônicos (com sacarose a 10%) que são os indicados para isolamento de formas L de bactérias, ou seja, organismos sem parede celular. Ela fornece também meios com resinas, capazes de inibir a ação de determinados antibióticos. Deve ser acentuado que os meios hipertônicos podem acarretar certa dificuldade ao exame visual devido à rápida hemólise que ocorre quando da adição de sangue²¹. Essa possibilidade aconselha sementeiras freqüentes e repetidas subculturas.

Uma ocorrência significativa é a presença de determinadas cepas de estreptococos do grupo *viridans* que exigem, para seu desenvolvimento, meios especiais de cultura ou presença de outros germes. São os estreptococos considerados como “nutritivamente deficientes” ou denominados “satélites”, cujo isolamento não é fácil. Seu crescimento depende da presença de cloridrato de piridoxina (0,001%), para aeróbios, ou de L-cisteína (0.05%) para anaeróbios, nos meios utilizados. Essas cepas foram inicialmente (1961) reconhecidas como formas L de bactérias que causavam endocardite e otite média²². Ulteriormente, manifestaram-se como agentes importantes de EI e que devem sempre ser procurados^{23, 24}.

Em nosso Laboratório, essa pesquisa é realizada de rotina. Até o momento, tais formas bacterianas representaram 2% dos estreptococos do grupo *viridans* causadores de endocardite. Para instituições que não disponham dos suplementos necessários, aconselhamos sementeira transversal de uma cepa de *Staphylococcus aureus* associada a subcultura da amostra em placa de agar-sangue.

Avaliação dos resultados

Pelo método radiométrico, a quantidade de CO₂, marcado com carbono 14 e liberado na atmosfera do frasco de hemocultura é transformada pelo aparelho Bactec em um “índice de crescimento”; quando este é superior ao valor de 30 unidades, o processo é sugestivo de crescimento bacteriano.

Resultados falso-positivos já foram relatados por alguns examinadores quando do uso desse sistema e manifestaram-se eventualmente em nosso Laboratório. Esta ocorrência está ligada ao metabolismo de substratos marcados com C¹⁴ por células do sangue do paciente²⁵⁻²⁷. Este fenômeno é mais comum em hemoculturas de recém-nascidos, cujas células sangüíneas são metabolicamente mais ativas²⁶. Diante dessa possibilidade, modificamos o limiar de sensibilidade do aparelho de 30 para 40 unidades, para considerar determinada amostra como positiva.

Tipos de meio de cultura

O período de observação de uma hemocultura é, em média, de sete dias. Essa observação pode ser realizada diariamente através do método radiométrico ou por técnicas tradicionais por exame microscópico pela técnica de Gram ou da “acridine-orange”, além das subculturas habituais. Em algumas eventualidades, como já mencionado, pode ser admitida uma expectativa mais longa. Em nossa experiência, a incubação além de uma semana, com ou sem utilização do método radiométrico, só vem sendo efetivada quando do uso prévio de antibioticoterapia ou quando da suspeita de infecções por fungos, *Brucella sp*, *Haemophilus*.

Uma situação importante refere-se à presença de hemoculturas positivas para bactérias habitualmente saprófitas, assim *Staphylococcus epidermidis* e bacilos Gram-positivos do tipo difteróide, que podem exteriorizar apenas ocorrência de contaminação local. Sabemos, entretanto, que elas podem ser responsáveis por graves infecções humanas. Entre nós, ainda recentemente, foi relatada caso de EI por bacilo de tipo difteróide, o *Corynebacterium* do grupo JK²⁸. E é conhecida, hoje, a capacidade de agressão desses dois tipos de microorganismos, particularmente em indivíduos submetidos à cirurgia cardíaca para implante de próteses ou em enfermos imunodeprimidos por períodos demorados²⁹. Dessa forma, o real significado desses germes só deverá ser aceito em situações de sua presença em múltiplas culturas.

Em nossa experiência, *Staphylococcus epidermidis* foi agente de EI em 3 (12%) de 25 pacientes com infecção valvar instalada em indivíduos sem valvopatia anterior³⁰ e em 2 (4,8%) de 41 enfermos com baixa idade³¹.

Dentre os diferentes microorganismos encontrados em portadores de EI compareceram com maior freqüência, em nossa estatística, estreptococos e estafilococos, ocorrência que praticamente se superpõe à observada em todo o mundo.

Em infecções instaladas em pacientes sem sinais de valvopatia prévia, um agente causal pôde ser identificado em 25 de 33 enfermos (76%)³⁰. Em 14 (56%) destes o *Staphylococcus aureus* foi a bactéria encontrada e em 5 (20%) outros, o *Streptococcus viridans*. Já em doentes jovens, o último germe foi o responsável pela infecção em 13 (31,6%) de 41 pacientes e o primeiro em 12 (29,2%) deles³¹.

Nossa experiência atual, baseada no exame de 30 portadores de EI³², evidencia o predomínio dessas bactérias (Tabela D, particularmente as do grupo heterogêneo *viridans*. Como se verifica *Staphylococcus epidermidis* foi agente causal em 14 (4,7%) das infecções e fungos em apenas 4 delas.

A visão de conjunto revela que culturas negativa estiveram presentes em 17% dos casos (Tab. D, o que exterioriza a satisfatória obtenção de hemocultura positivas em 83% deles.

TABELA I - Microorganismos isolados por hemoculturas em pacientes com endocardite infecciosa (300 casos).

Microorganismo	Número de casos	& do total de casos
Streptococcus, grupo viridans	93	31
Streptococcus faecalis	21	7
Strept. D, não enterococo	19	6,3
Streptococcus sp	14	4,7
Staphylococcus aureus	59	19,7
Staphylococcus epidermidis	14	4,7
Bactérias Gram-negativas	16	5,3
Outras bactérias	8	2,7
Fungos	4	1,3
Indeterminado (hemoc. Negativa)	52	17,3

Seg. Mansur, 1987³²

Novas técnicas de exame

Determinadas normas de trabalho vêm, atualmente, contribuindo para maior eficiência das provas. A metodologia mais recente na obtenção de hemoculturas está representada por uso dos aparelhos Bactec NR 660 e Bactec NR 730 que detectam, pr infravermelho, o CO₂ liberado pelo crescimento de microorganismos através do metabolismo de substratos. Esses aparelhos possuem capacidade para incubação de 600 amostras, que podem ser lidas duas vezes ao dia, durante os sete dias de exame.

A vantagem deste sistema sobre o Bactec 460 está em não utilizar substratos marcados com carbono 14. O reconhecimento de hemoculturas positivas ocorre precocemente, podendo cerca de 93% dos isolamentos bacterianos se processarem até o segundo dia³³.

Outros métodos, recentemente descritos e fornecedores de bons resultados são o sistema biofásico Septicheck (Roche), a denominada "Isolator lysis centrifugation" (Du Pont), a técnica de monitorização por alterações de impedância da corrente alternada (Bactometer), o "Antimicrobial removal device" (ARD). Não possuímos experiência com eles.

Os dados atuais vêm evidenciando, portanto, o grande avanço da Microbiologia Clínica nos últimos anos. Novas técnicas diagnósticas, além de tornarem mais precoces os resultados, ainda os reconhecem com grande sensibilidade e com segura especificidade. Não há dúvida que os progressos decorrem do surgimento de sistemas de automação, de avanços na área de imunologia, em particular com produção de anticorpos monoclonais e da participação da engenharia genética, com uso de sondas de ADN com finalidade diagnóstica.

A conveniência, as vantagens e, mesmo a necessidade, destas técnicas de trabalho são evidentes em quaisquer processos septicêmicos. E tornam-se muito expressivas em todas as modalidades de endocardite infecciosa.

REFERÊNCIAS

- Weinstein L, Rubin RH — Infective endocarditis — 1973. Prog Cardiovasc Dis, 16: 274,1973.
- Washington II JA — Blood cultures. Principles and techniques. Mayo Clin Proc, 50: 91,1975.
- Décourt LV — Análise de alguns parâmetros no diagnóstico das endocardites infecciosas, Atualização cardiol (SOCESP), 1(2), 1981.
- Berkelman RL, Lewin S, Allen JR, Anderson RL, Budnick LD, Shapiro S, Friedman SM, Nicholas P, Hultzman RS, Haley RW — Pseudobacteremia attributed to contamination of povidone-iodine with **Pseudomonas cepacia**. Ann int Med. 95: 32, 1981.
- O'Keefe JP, Gorgach SL — Laboratory diagnosis of infective endocarditis, in Rahimtoola SH (ed) — Infective endocarditis, New York, Grune & Stratton, 1978, p-307
- Hall MM, Ilstrup DM, Washington II JÁ — Effect of volume of blood cultured on detections of bacteremia. J clin Microbiol, 3: 643, 1976.
- Washington II JÁ — Conventional approaches to blood culture, in Washington II JA (ed) — The detection of septicemia, West Palm Beach, CRC Press, 1978, p. 41.
- Franciosi RA, Favara BA — A single blood culture for confirmation of the diagnosis of neonatal septicemia. Am J clin Pathol, 57: 215, 1972
- Beeson PB, Branion ES, Warren JV — Observations on the sites of removal of bacteria from the blood in patients with bacterial endocarditis. J exp Med. 81: 9,1945.
- Bennett JR IL, Beeson PB — Bacteremia: A consideration of some experimental and clinical aspects. Yale J Biol Med. 26: 241, 1954.
- Reller LB — Laboratory procedures in the management of infective endocarditis, in Bisno AL (ed) — Treatment of infective endocarditis, New York, Grune & Stratton, 1981, p. 235.
- Traub WH, Lowrance BL — Anticomplementary, anticoagulatory, and serum-protein precipitating activity of sodium polyanetholsulfonate. Appl Microbiol, 20: 465,1970.
- Belding ME, Klebanoff SJ — Effect of sodium polyanetholsulfonate on antimicrobial system in blood. Appl Microbiol, 24: 691, 1972.
- Reller LB, Murlay PR, Mac Lowry JD — Blood cultures II. Cumitech 1A, American Society Microbiology, Washington, 1982.
- Von Heebler T, Miles AA — The action of sodium polyanetholsulfonate ("Liquoid") on blood cultures. J Pathol Bacteriol, 25: 541, 1925.
- Rosner R — Effect of various anticoagulants and no anticoagulants on ability to isolate bacteria directly from parallel clinical blood specimens. Am J clin Pathol, 49: 216,1968.
- Rintala L, Pollock HM — Effects of two blood culture anticoagulants on growth of **Neisseria meningitidis**. J clin Microbio, 7: 332, 1978.
- Pai CH, Sorger S — Enhancement of recovery of Neisseria meningitidis by gelatin in blood culture media. J clin Microbiol, 14: 20, 1981.
- Wilkins TD, West SEH — Medium-dependent inhibitions of *Pep. tostrectococcus anaerobins* by sodium polyanetholsulfonate in blood culture media. J clin Microbiol, 3: 393, 1978.
- Rosner R — Comparison of macroscopic, microscopic, and radiometric examinations of clinical blood cultures in hypertonic media. Appl Microbiol, 28: 644,1974.
- Frenkel A, Hirsch W — Spontaneous development of L forms of streptococci requiring secretions of other bacteria or sulphhydryl compounds for normal growth. Nature (London), 191: 728, 1961.
- Cayeux P, Acar JF, Chabbert YA — Bacterial persistence in streptococcal endocarditis due to thiol-requiring mutants. J infec Dis, 124: 247, 1971.
- McCarthy LR, Butone EJ — Bacteremia and endocarditis caused by satellitating streptococci. Am J clin Pathol, 61: 585, 1974.
- Renner ED, Gatheridge LA, Washington II JÁ — Evaluation of radiometric system for detecting bacteremia. Appl Microbiol, 26: 368, 1973.
- Banatyne RM, Harnett N — Radiometric detections of bacteremia in neonates. Appl. Microbiol, 27: 1067,1974.
- Thiemke WA, Wicher K — Laboratory experience with a radiometric method for detecting bacteremia. J clin Microbiol, 1:

- 302, 1975, 28. Pereira VG, Amato Neto V, Mendes CMF, Pileggi F, Uip DE, Francisco W — Endocardite infecciosa causada por *Coryne bacterium do grupo JK*. Relato de caso. Arq Bras Cardiol, 44: 191, 1985.
29. McGregor RR, Beaty HN — Evaluation of positive blood cultures: guidelines for early defferentation of contaminated from valid Positive cultures. Arch in Med. 130: 84,1972.
30. Grinberg M, Kehde EB, Mansur AJ, Lopes EA, Verginelli G, Décourt LV, Pileggi F — Infecção valvar em pacientes sem evidencia de valvopatia prévia. Arq Bras Cardiol, 42: 267,1984.
31. Grinberg M, Mansur AJ, Snitcowsky R, Ebaid M, Décourt LV, Pileggi F — Endocardite infecciosa em pacientes jovens. Arq Bras Cardiol, 44: 87,1985.
32. Mansur AJ — Avaliação da probabilidade de óbito em portadores de endocardite infecciosa. Tese Doutorado, Faculdade de Medicina da USP, 1987.
33. Courcol RJ, Frunchart A, Roussel-Delvallez M, Martin GR — Routine evaluation of nonradiometric Bactec NR 660 system. J clin Microbiol, 24: 26,1986.