

Avaliação da estabilidade de parâmetros citológicos e bioquímicos do liquor

Assessment of cytological and biochemical parameters stability in cerebrospinal fluid

Renan Domingues; Fernando Brunale; Gustavo Bruniera; Carlos Senne

Senne Liquor Diagnóstico, São Paulo, São Paulo, Brasil.

RESUMO

Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar a estabilidade, em 12 horas, de parâmetros citológicos e bioquímicos do liquor. **Métodos:** Amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) foram aliqüotadas em cinco diferentes tubos e armazenadas em temperatura ambiente. A primeira aliqüota foi imediatamente analisada e as demais, analisadas após 2, 4, 6 e 12 horas. Para avaliação citológica, foram incluídas amostras com pelo menos 20 leucócitos/mm³. Foi realizada análise de variância dos resultados e a comparação da interpretação clínica dos resultados nos diferentes tempos. **Resultados:** Não houve redução significativa no número de leucócitos e hemácias por análise de variância (ANOVA). A interpretação clínica da citologia não resultou em resultados diferentes em nenhum dos tempos avaliados. Não houve variação significativa dos parâmetros bioquímicos. **Conclusão:** Os resultados sugerem que o armazenamento de amostras de LCR por 12 horas em temperatura ambiente não compromete significativamente a interpretação clínica. Estudos futuros deverão avaliar o comportamento desses parâmetros em amostras com contagens de células mais próximas aos valores limítrofes.

Unitermos: líquido cefalorraquidiano; leucócitos; bioquímica; neutrófilos; linfócitos.

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to evaluate the stability, in 12 hours, of cytological and biochemical parameters of the cerebrospinal fluid (CSF). **Methods:** Cerebrospinal fluid (CSF) samples were aliquoted into five different tubes and stored at room temperature. The first aliquot was immediately analyzed and the others analyzed after 2, 4, 6 and 12 hours. For cytological analysis, samples of at least 20 leukocytes/mm³ were included. Analysis of variance of the results and the comparison of the clinical interpretation of the results at the different times were performed. **Results:** There was no significant decrease in the number of leukocytes and erythrocytes by the analysis of variance (ANOVA). The clinical interpretation of the cytology did not result in different results in any of the evaluated times. There was no significant variation in the biochemical parameters. **Conclusion:** The results suggest that the storage of CSF samples for 12 hours at room temperature does not significantly compromise clinical interpretation. Future studies are still required in order to evaluate the behavior of these parameters in samples of cell counts closer to bounded values.

Key words: cerebrospinal fluid; leukocytes; biochemistry; neutrophils; lymphocytes.

RESUMEN

Objetivo: El objetivo de este estudio fue evaluar la estabilidad, en 12 horas, de parámetros citológicos y bioquímicos del líquido cefalorraquídeo (LCR). **Métodos:** Muestras de LCR fueron alicuotadas en cinco viales diferentes y almacenadas a temperatura ambiente. La primera alícuota fue inmediatamente analizada y las demás, analizadas tras 2, 4, 6 y 12 horas. Para la evaluación citológica, se incluyeron muestras con al menos 20 leucocitos/mm³. Se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados y la comparación de su interpretación clínica en los diferentes tiempos. **Resultados:** No hubo reducción significativa en el número de leucocitos y hematíes por ANOVA. La interpretación clínica de la citología no mostró resultados diferentes en ningún de los tiempos evaluados. No hubo variación significativa de los parámetros bioquímicos. **Conclusión:** Los resultados sugieren que el almacenamiento de muestras de LCR por 12 horas a temperatura ambiente no compromete significativamente la interpretación clínica. Nuevos ensayos deben evaluar el comportamiento de esos parámetros en muestras con recuentos de células más cercanas a los valores límite.

Palabras clave: líquido cefalorraquídeo; leucocitos; bioquímica; neutrófilos; linfocitos.

INTRODUÇÃO

O líquido cefalorraquídeo (LCR) é um fluido corporal dinâmico amplamente utilizado no diagnóstico de muitas doenças tumorais, inflamatórias, infecciosas, vasculares e degenerativas⁽¹⁾. Vários parâmetros do LCR, como proteínas, glicose, lactato, glóbulos brancos e vermelhos, entre outros, são medidos sistematicamente, e seus padrões podem sugerir a presença de um processo patológico em particular^(2,3).

O LCR é normalmente obtido por punção lombar (PL) e coletado em tubos apropriados. Após sua coleta, os tubos são transportados para o laboratório e há um período de tempo variável para que a análise seja realizada. Esse período é determinado por diversos fatores, como a distância entre o hospital e o laboratório de análise, por exemplo. As amostras também podem ser coletadas em locais onde não haja um laboratório especializado, e precisam ser enviadas para um laboratório de referência. Considerando o período de tempo entre a coleta e a análise do LCR, é importante conhecer a estabilidade dos seus componentes para entender como isso influencia a interpretação clínica dos resultados do LCR.

Previamente, com base na opinião de especialistas e também em estudos experimentais com inoculação de glóbulos brancos em amostras de LCR estéreis⁽⁴⁾, sugeriu-se que o exame citológico deva ser realizado dentro de 2 horas após a PL⁽⁵⁾. No entanto, esses dados não refletem necessariamente o que acontece com as amostras clínicas nas condições em que o LCR é realmente armazenado. Além disso, pouco se sabe sobre a estabilidade de outros componentes do LCR, como os parâmetros bioquímicos⁽⁶⁾. O objetivo deste estudo foi investigar a estabilidade de leucócitos, hemácias, proteínas, glicose e lactato do LCR durante 12 horas.

MÉTODOS

Todas as amostras de LCR incluídas no presente estudo foram obtidas para fins clínicos. Médicos do Senne Liquor Diagnóstico realizaram as PLs. O tempo entre a retirada do LCR e a análise inicial demorou até 2 horas. As amostras de LCR foram armazenadas a 17°C em temperatura ambiente durante as análises.

Análise de glóbulos brancos e vermelhos

Quinze amostras de LCR coletadas de 15 pacientes submetidos a PL por recomendação médica foram utilizadas para análise de estabilidade de glóbulos brancos e vermelhos. Todas elas foram enviadas para a unidade principal do Laboratório do Senne Liquor Diagnóstico, de acordo com as normas das autoridades brasileiras [Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), RDC 20/2014]. Essas amostras foram alíquotadas em cinco tubos diferentes, os quais foram analisados em cinco tempos de espera: T0, T1 (2 horas), T2 (4 horas), T3 (6 horas) e T4 (12 horas). Todos os tubos foram armazenados à temperatura ambiente. Todas as amostras apresentaram inicialmente o mínimo de 20 leucócitos/mm³. Os leucócitos totais e as hemácias foram contados em uma câmara de contagem Fuchs-Rosenthal, e a contagem diferencial de células foi realizada após sedimentação e coloração⁽⁷⁾. Amostras menor que 100 leucócitos/mm³ foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. O mesmo procedimento foi realizado nas cinco alíquotas. Analisamos a variância da contagem de leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos e hemácias, bem como a relação neutrófilos/linfócitos. A pleocitose no LCR foi classificada

como leve (20-50 células/mm³), moderada (50-200/mm³) ou marcada (> 200/mm³). Realizamos o registro do padrão de pleocitose, bem como do predomínio de polimorfonucleares (PMN) ou linfomononucleares (LMN); realizou-se uma comparação entre os cinco períodos de tempo de cada amostra de LCR.

Análises de glicose, proteínas e lactato

Para análise bioquímica de estabilidade, foram avaliadas 20 amostras de LCR coletadas por recomendação médica de 20 pacientes submetidos a PL. Essas amostras de LCR foram enviadas para a unidade principal do Laboratório Senne Liquor Diagnóstico, de acordo com a RDC 20/2014 da Anvisa. As concentrações de glicose, proteína e lactato foram determinadas por colorimetria. Todas as amostras de LCR foram aliquotadas em cinco tubos diferentes. Cada uma dessas alíquotas foi analisada em cinco períodos de tempo: T0, T1 (2 horas), T2 (4 horas), T3 (6 horas) e T4 (12 horas).

Análise estatística

A análise de variância de leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos, relação neutrófilos/linfócitos e concentrações de hemácias, glicose, proteínas e lactato nos diferentes tempos foi realizada pelo programa *one-way* análise de variância (ANOVA). O teste de comparações múltiplas de Tukey foi usado para determinar quais dessas médias diferem das demais. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. O programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA) foi utilizado para todas as análises estatísticas.

RESULTADOS

Glóbulos brancos e vermelhos

Os achados do LCR deste grupo são apresentados na **Tabela 1**. A média total de leucócitos, neutrófilos, linfócitos, relação neutrófilos/linfócitos e os valores de hemácias são apresentados na **Tabela 2**. Não foi encontrada variância significativa para os leucócitos totais ($p = 0,15$), neutrófilos ($p = 0,27$), linfócitos ($p = 0,15$), relação neutrófilos/linfócitos ($p = 0,11$) e hemácias ($p = 0,39$). O teste de comparações múltiplas de Tukey não mostrou diferenças significativas entre T0, T1, T2, T3 e T4 para nenhuma dessas variáveis.

Em T0, quatro LCRs apresentaram pleocitose leve com predomínio de LMN; três, pleocitose leve com predomínio de PM;

um, pleocitose moderada com predomínio de LMN; três, pleocitose moderada com predomínio de PMN; três, pleocitose acentuada com predomínio de LMN; e um, pleocitose acentuada com predominância de PMN. O padrão de pleocitose e a predominância do tipo de célula permaneceram inalterados em T1, T2, T3 e T4 para todas as amostras de LCR.

Glicose, proteínas e lactato

Os valores médios de glicose, proteínas e lactato são apresentados na **Tabela 3**. Não foi encontrada variação significativa com a ANOVA para nenhuma dessas variáveis. O teste de comparações múltiplas de Tukey não mostrou diferenças significativas entre as médias de glicose, proteína e lactato para T0, T1, T2, T3 e T4.

TABELA 1 – Achados de LCR em amostras usadas para avaliação da estabilidade citológica

LCR	Leucócitos (mm ³)	Neutrófilos (%)	Linfócitos (%)	Proteína (mg/dl)	Glicose (mg/dl)	Lactato (mg/dl)
1	200	79	12	214	32	49,7
2	20	35	18	108	48	29,1
3	178	55	38	36	50	14,9
4	35	55	28	380	37	61,8
5	4800	78	10	7400	37	61,8
6	25	0	95	89	56	14,4
7	110	13	75	184	19	29
8	20	2	78	33	49	13,5
9	699	0	77	47	53	15,2
10	290	1	93	107	32	23,5
11	550	32	58	60	51	41,2
12	133	60	33	57	55	34,2
13	20	31	52	39	40	23,8
14	44	64	34	56	44	28,6
15	21	2	96	53	41	21,7

LCR: líquido cefalorraquidiano.

TABELA 2 – Análise do total de leucócitos, linfócitos, neutrófilos, contagem de hemácias e relação neutrófilos/linfócitos em cinco períodos diferentes

	0 (média ± DP)	2 h (média ± DP)	4 h (média ± DP)	6 h (média ± DP)	12 h (média ± DP)	<i>p</i>
Total de leucócitos (mm ³)	476 ± 1214	447 ± 1138	439 ± 1115	416 ± 1037	379 ± 936	0,15
Neutrófilos (mm ³)	288 ± 958	261 ± 863	261 ± 869	250 ± 828	223 ± 738	0,27
Linfócitos (mm ³)	128 ± 182	129 ± 191	125 ± 183	125 ± 185	117 ± 172	0,15
Relação Neutrófilos/linfócitos	1,908 ± 2,826	2,022 ± 2,884	2,110 ± 3,130	2,021 ± 2,927	2,436 ± 3,888	0,11
Hemácias (mm ³)	12110 ± 48425	10894 ± 43585	9130 ± 36310	8486 ± 33896	6098 ± 24204	0,39

DP: desvio padrão.

TABELA 3 – Análise da média de proteínas, lactate e glicose em cinco períodos diferentes

	0	2 h	4 h	6 h	12 h	<i>P</i>
	(média ± DP)	(média ± DP)	(média ± DP)	(média ± DP)	(média ± DP)	
Proteína (mg/dl)	34,55 ± 12,1	34,7 ± 13,05	34,55 ± 12,16	34,85 ± 12,9	34,5 ± 12,29	0,9
Lactato (mg/dl)	14,45 ± 3,03	14,35 ± 3,03	14,4 ± 2,93	14,65 ± 3,04	14,35 ± 2,92	0,08
Glicose (mg/dl)	60,8 ± 14,71	60,85 ± 15,01	60,85 ± 14,98	60,90 ± 14,75	61,4 ± 14,66	0,11

DP: desvio padrão.

DISCUSSÃO

Não encontramos diminuição estatisticamente significativa na contagem de leucócitos e hemácias pela análise de variância ao longo de 12 horas em amostras de LCR armazenadas à temperatura ambiente. Além disso, nenhuma das análises citológicas resultou em diferentes interpretações clínicas ao longo de 12 horas de armazenamento do LCR à temperatura ambiente. Tanto quanto sabemos, nenhum estudo prévio avaliou a variação citológica durante 12 horas em amostras de LCR armazenadas à temperatura ambiente. Foi dada recomendação Classe IV para avaliação citológica dentro de 2 horas por conta da potencial lise de glóbulos brancos e vermelhos^(4, 8). Dados experimentais anteriores mostraram uma diminuição significativa de neutrófilos após uma hora e de linfócitos após três horas⁽⁵⁾. Nossos achados sugerem que a diminuição na contagem de leucócitos não afeta significativamente a interpretação clínica de amostras de LCR com pelo menos 20 leucócitos/mm³, armazenadas à temperatura ambiente. Na prática clínica, muitas vezes é difícil realizar análises de LCR logo após a coleta. Muitos hospitais e clínicas não têm o serviço e precisam encaminhar para outros laboratórios as amostras de LCR. Nossos resultados sugerem que isso pode não interferir significativamente no resultado final da análise de LCR.

Não encontramos variação significativa nos resultados de glicose, proteína e lactato em 12 horas. Esse tema já foi estudado previamente. Um trabalho avaliou a estabilidade da glicose e do lactato no LCR⁽⁹⁾. Os autores descobriram que esses parâmetros eram estáveis nas amostras de LCR armazenadas por 24 horas, em amostras com níveis normais ou altos de contagem de células de LCR⁽⁶⁾. Outro estudo mostrou que o lactato do LCR permaneceu estável ao longo de três dias em temperatura ambiente⁽¹⁰⁾. Portanto, nossos dados estão de acordo com estudos prévios de estabilidade da glicose e do lactato no LCR. A concentração de proteína também permaneceu estável em nosso estudo; entretanto, avaliamos apenas a concentração total de proteínas. Outras pesquisas são necessárias para avaliar a estabilidade de proteínas específicas, como albumina e imunoglobulina.

As limitações do presente estudo incluem o tamanho pequeno da amostra. Além disso, analisamos apenas amostras de LCR com o mínimo de 20 leucócitos/mm³ na avaliação inicial. Não é possível especular sobre variância citológica e interpretação clínica em amostras menores que 20 leucócitos/mm³ com nossos dados; portanto, ainda são necessários estudos adicionais nessa direção. Ademais, o presente trabalho avaliou o efeito do armazenamento do LCR apenas à temperatura ambiente. O laboratório onde este estudo foi realizado, como a maioria dos serviços, recomenda a análise do LCR assim que ele é recebido, armazenando-o a 4°C. Ainda é necessário avaliar a influência da temperatura na estabilidade dos parâmetros do LCR.

Mostramos que os parâmetros LCR permanecem relativamente estáveis, não afetando significativamente a interpretação clínica nas primeiras 12 horas de armazenamento à temperatura ambiente, sugerindo que as amostras de LCR podem ser encaminhadas com segurança a um serviço especializado nesse período.

REFERÊNCIAS

- Jerrard DA, Hanna JR, Schindelhof GL. Cerebrospinal fluid. J Emerg Med. 2001; 21(2): 171-8. PubMed PMID: 11489408.
- Seehusen DA, Reeves MM, Fomin DA. Cerebrospinal fluid analysis. Am Fam Physician. 2003; 68(6): 1103-8. PubMed PMID: 14524396.
- Huy NT, Thao NT, Diep DT, Kikuchi M, Zamora J, Hirayama K. Cerebrospinal fluid lactate concentration to distinguish bacterial from aseptic meningitis: a systemic review and meta-analysis. Crit Care. 2010; 14(6): R240. PubMed PMID: 21194480; PubMed Central PMCID: PMC3220013.
- Deisenhammer F, Bartos A, Egg R, et al.; EFNS Task Force. Guidelines on routine cerebrospinal fluid analysis. Report from an EFNS task force. Eur J Neurol. 2006; 13(9): 913-22. PubMed PMID: 16930354.
- Steele RW, Marmer DJ, O'Brien MD, Tyson ST, Steele CR. Leukocyte survival in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol. 1986; 23(5): 965-6. PubMed PMID: 3711287.
- Dujmovic I, Deisenhammer F. Stability of cerebrospinal fluid/serum glucose ratio and cerebrospinal fluid lactate concentrations over 24 h: analysis of repeated measurements. Clin Chem Lab Med. 2010; 48(2): 209-12. PubMed PMID: 19958211.

7. Anguiano GL, Ancira GV. Direct simultaneous total and differential leukocyte counts in the counting chamber. *Acta Haematol.* 1955; 13(2): 124-7. PubMed PMID: 14361097.
8. UK National External Quality Assessment Scheme for Immunochemistry Working Group. National guidelines for analysis of cerebrospinal fluid for bilirubin in suspected subarachnoid haemorrhage. *Ann Clin Biochem.* 2003; 40(Pt 5): 481-8. PubMed PMID: 14503985.
9. Levine J, Panchalingam K, McClure RJ, Gershon S, Pettegrew JW. Stability of CSF metabolites measured by proton NMR. *J Neural Transm (Vienna).* 2000; 107(7): 843-8. PubMed PMID: 11005549.
10. Zhang L, Gabler J, Payto D, Wang S. Stability of lactate and pyruvate in cerebrospinal fluid under typical clinical laboratory storage conditions. *Clin Biochem* 2015; 48(9): 631-2. PubMed PMID: 25863113.

AUTOR CORRESPONDENTE

Renan Domingues  0000-0002-6058-7937
e-mail: renan.domingues@senneliquor.com.br



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.