

L o r e n o B r e n t a n o

= M É T O D O Q U A N T I T A T I V O . =
PARA ANÁLISE BACTERIOLÓGICA DE QUEIMADURAS

Tese apresentada para concorrer ao
Título de Docente Livre da Cadeira
de Clínica Propedêutica Cirúrgica,
da Faculdade de Medicina, da Uni-
versidade Federal do Rio Grande do
Sul.

Porto Alegre



1966



Ao Dr. Moyer:

- (1) Cirurgião com espírito clínico sutil;
- (2) Professor Universitário com didática excepcional;
- (3) Pesquisador clínico sedimentado em ciências fundamentais;
- (4) Homem de princípios definidos.

I N D I C E

- 1 - Introdução
- 2 - Material e Métodos
- 3 - Resultados
- 4 - Discussão
- 5 - Sumário e Conclusões
- 6 - Bibliografia





Introdução

Tem havido notável progresso no entendimento biológico dos traumatismos causados por agentes térmicos. A aplicação clínica desses conhecimentos melhorou a sobrevida do grande queimado (19, 22). Ao produzir necrose da epiderme, a queimadura destrói uma barreira eficaz contra a infecção. Se é extensa, provoca depressão dos mecanismos de defesa locais e gerais (1, 16, 23, 24). O fator mecânico associado ao fator imunológico condicionam a ocorrência sistemática de infecção no grande queimado que sobrevive à fase inicial de choque (2, 19, 21). Surpreende a limitação do conhecimento no que concerne ao comportamento dos agentes etiológicos dessa infecção. A primeira investigação bacteriológica em queimaduras, com alguma sistemática, foi relatada por Cruishank, em 1935 (7). Pensou-se que os antibióticos dariam solução ao problema, mas a esperança não durou muito (14). Pesquisas recentes, em número grande de enfermos, onde culturas foram tomadas com regularidade, tornaram clara a alta incidência de Staphylococcus aureus e Pseudomonas aeruginosa, tanto na ferida queimada como em disseminações sistêmicas (3, 8, 15, 18, 25, 27, 28).

Esses estudos restringiram-se a análises qualitativas. Poucos esforços foram dispendidos na investigação bacteriológica quantitativa da ferida queimada. Moncrief e seu grupo fizeram detalhados estudos dessa natureza em material de necropsia (20). Lindberg comenta a baixa densidade bacteriana em feridas de pacientes tratados com "Sulfamylon" tóxico (17).

Não existia, no entanto, análise quantitativa sistemática que compreendesse todo o período evolutivo da doença, por falta de um método adequado. Esta tese analisa o método utilizado em trabalho recentemente publicado (6). O mesmo foi realizado enquanto o autor participava nas atividades de um dos grupos que mais

influência teve no desenvolvimento recente do estudo de queimaduras nos E.E.UU. (24,26), e foi comunicado ao último Congresso da American Society for Microbiology (5).

O método, após testada sua validade em laboratório, foi tornado rotina na "Hartford Foundation Burn Unit", do Barnes Hospital, filiado à Washington University. Os dados foram colhidos em pacientes, cujas queimaduras cobriam 25% ou mais da superfície corporal, tratados com nitrato de prata a 0,5%.

A tese analisa, tanto a validade do método estudada em laboratório e em tecido proveniente dos pacientes, quanto os resultados obtidos com a aplicação do método em investigação sistemática feita durante toda a evolução hospitalar de 26 pacientes com queimaduras extensas. Os resultados evidenciaram sua utilidade e demonstraram a eficácia antibacteriana do nitrato de prata no tratamento de queimaduras.

A nomenclatura e taxonomia bacterianas, seguidas neste trabalho, obedecem à última edição de Bergey (4), com exceção das enterobacteriáceas, para as quais são adotados os pontos de vista de Edwards e Ewing (10).





M a t e r i a l e M é t o d o

Esta tese analisa um método bacteriológico para cultura quantitativa em queimaduras. Propõe-se-lhe a designação de "gase molhada". Compressa de gase, em 4 camadas, medindo 25 cm², com espessura média de 0,4 cm, impregnada com solução estéril de cloreto de sódio a 0,9%, é colocada, com mão envolta em luva estéril, sobre a área escolhida e aí mantida durante 5 minutos. Logo após, a mesma é levada, ainda com luva estéril, para um frasco de Erlenmeyer com 125 ml. de capacidade, contendo 50 ml. de caldo tripticase-soja BBL. O frasco é mantido em temperatura ambiente e em período de tempo que varia de 20 a 30 minutos, são feitas:

- diluições pelo método "pour plate", com razão incremental de 1/10, usando solução de cloreto de sódio a 0,9% como diluente - para análises quantitativas;
- semeadura em placas de Petri contendo meios de ágar-sangue, ágar-eosina-azul de metileno (Teague) e ágar-sangue-alcool fenílico (9) - para análises qualitativas.

Frascos e placas, são então incubados a 37°. As placas com inóculo qualitativo analisam-se no dia seguinte, as bactérias são identificadas através de subinoculações, e seu número proporcional é contado nas placas. As "pour plates" contam-se 48 horas após inoculação.

A averiguação da densidade bacteriana por unidade de área é feita da maneira descrita a seguir. Determina-se o número de bactérias presentes em cada mililitro de caldo tripticase-soja do frasco de Erlenmeyer. Multiplica-se esse dado por 50, volume de caldo no frasco e obtém-se a quantidade total de bactérias existentes no frasco e, por conseguinte, o número total de bactérias que impregnam a gase posta sobre a queimadura.

Divide-se êsse resultado por 25, área da gase em centímetros quadrados, determinando-se a concentração bacteriana recebida de cada centímetro quadrado de área queimada. Assim, se houver contagem de 3×10^4 bactérias por mililitro de caldo tripticase-soja, obter-se-á:

$$3 \times 10^4 \text{ bact/ml} \times \frac{50 \text{ ml caldo}}{25 \text{ cm}^2 \text{ gase}} = 6 \times 10^4 \text{ bact/cm}^2 \text{ de área}$$

queimada, ou seja, multiplica-se, simplesmente, por dois, o número de bactérias determinado para cada mililitro de caldo. No caso:

$$3 \times 10^4 \text{ bact/ml caldo} \times 2 = 6 \times 10^4 \text{ bact/cm}^2 \text{ área queimada.}$$

A solução de cloreto de sódio a 0,9% foi escolhida como veículo líquido por ser de obtenção fácil em forma estéril e por ter demonstrado em 10 experiências um recebimento bacteriano comparável ao demonstrado simultaneamente com caldo tripticase-soja e tioglicolato líquido (fig. 1).

O tempo de permanência da gase em contacto com a área analisada foi determinado por tentativas. Fizem-se 10 experiências em que 5 gases, impregnadas com cloreto de sódio a 0,9%, foram colocadas simultaneamente sobre uma mesma área queimada, de superfície homogeneamente igual. As gases eram retiradas uma a uma, após 1, 2, 3, 5 e 7 minutos de contacto, e tratadas da mesma forma descrita acima. Verificou-se que entre 3 e 7 minutos o recebimento bacteriano foi comparável e nitidamente maior do que em períodos menores do que 3 minutos (fig. 2). Daí a decisão de manter o contacto durante 5 minutos.

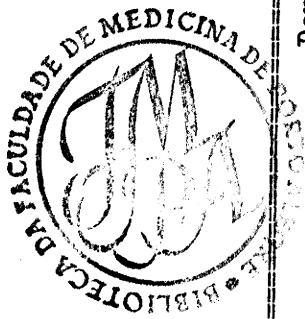
As bactérias, quando passam de um meio ambiente para outro, entram na fase "lag", durante a qual não existe multiplicação significativa (29). A duração desse período varia com a espécie bacteriana, os meios de cultura utilizados e a temperatura. O período entre 20 e 30 minutos após inoculação dos frascos de Erlenmeyer, contendo caldo tripticase-soja, é compreendido na fase "lag" para as bactérias recolhidas das queimaduras e permite livre disseminação das mesmas da rede de gase para o caldo. Em 5 culturas, as contagens bacterianas foram feitas aos 10, 20, 30, 45 e 60 minutos e não houve diferença significativa nos resultados (fig. 3).



Densidade bacteriana por cm²

Veículo	Exp. 31	Exp. 32	Exp. 33	Exp. 34	Exp. 35	Exp. 36	Exp. 37	Exp. 38	Exp. 39	Exp. 40
NaCl 0,9%	2x10 ⁴	8.5x10	7.9x10 ⁵	4x10 ⁰	neg.	8.2x10 ⁴	9.4x10 ⁵	1.2x10 ⁵	8.3x10 ⁴	2.4x10 ²
TSB	3.5x10 ⁴	2.2x10 ²	3.8x10 ⁵	7x10 ⁰	neg.	6.3x10 ⁴	7.1x10 ⁵	7.8x10 ⁴	2.1x10 ⁵	9x10
Tioglicolato.	9.2x10 ³	1.5x10 ²	5.4x10 ⁵	2x10 ⁰	2x10 ⁰	6.0x10 ⁴	3.4x10 ³	6.3x10 ⁴	3.2x10 ⁵	6.6x10

Fig. 1 -- Recebimento bacteriano (bact/cm²) em 10 culturas obtidas pelo método da "gase molhada". Amostras foram tomadas simultaneamente de uma mesma área com gases impregnadas de NaCl a 0,9%, caldo tripticase-soja e tiogliconato líquido.



Densidade bacteriana por cm^2

Tempo de contacto	Exp. 21	Exp. 22	Exp. 23	Exp. 24	Exp. 25	Exp. 26	Exp. 27	Exp. 28	Exp. 29	Exp. 30
1 minuto	8.4x10 ²	2x10 ⁰	9.4x10	2x10 ⁰	3x10 ³	7.2x10	-	-	3x10 ²	2x10 ⁰
2 min.	2.7x10 ³	2.5x10	7.4x10 ³	8x10 ⁰	6.3x10 ⁴	8.4x10 ³	-	4x10 ⁰	9.4x10 ²	-
3 min.	3.2x10 ⁴	9.4x10	3.5x10 ⁴	1.5x10	7.8x10 ⁵	1.4x10 ⁴	2x10 ⁰	8x10 ⁰	3.0x10 ²	3.4x10
5 min.	3.7x10 ⁴	3.2x10 ²	7.9x10 ⁴	1.2x10	2.1x10 ⁵	7.2x10 ⁴	-	6x10 ⁰	5.4x10 ⁴	8.3x10
7 min.	4.2x10 ⁴	2.4x10 ²	4.2x10 ⁴	2.4x10	4.2x10 ⁵	6.3x10 ⁴	4x10 ⁰	8x10 ⁰	3.1x10 ⁴	2.8x10
10 min.	3.5x10 ⁴	9.4x10 ²	9.4x10 ⁴		9.0x10 ⁵					

Fig. 2 - Recebimento bacteriano (bact/ cm^2) em 10 culturas obtidas pelo método da "gase molhada". Amostras foram tomadas simultaneamente da mesma área, variando o período de contacto da gase com a queimadura.



Tempo de permanência em caldo.	Densidade bacteriana por cm ²				
	Exp. 41	Exp. 42	Exp. 43	Exp. 44	Exp. 45
10 minutos	7.2 x 10 ⁴	2.5 x 10	6.4 x 10 ⁵	6.1 x 10 ³	3 x 10 ⁰
20 minutos	8.7 x 10 ⁴	2.2 x 10	3.8 x 10 ⁵	1.1 x 10 ⁴	4 x 10 ⁰
30 minutos	4.1 x 10 ⁴	2.4 x 10	5.7 x 10 ⁵	9.1 x 10 ³	2 x 10 ⁰
45 minutos	6.0 x 10 ⁴	2.8 x 10	7.2 x 10 ⁵	8,4 x 10 ³	3 x 10 ⁰
60 minutos	8.2 x 10 ⁴	2.5 x 10	4.1 x 10 ⁵	9,8 x 10 ³	5 x 10 ⁰

" 15 "

Fig. 3 - Recebimento bacteriano (Bact/cm²) em 5 culturas obtidas pelo método da "gase molhada". As amostras foram deixadas em caldo por tempo variável, antes de fazer as "pour plates".



O método da "gase molhada" foi testado:

- no laboratório, antes de sua introdução clínica;
- em pacientes, na fase inicial do trabalho.

No laboratório: dois mililitros de culturas de S. aureus e P. aeruginosa, agitadas durante 6 horas e quantificadas pelo método "pour plate", foram estendidos sobre placas e deixados secar durante 15 minutos à temperatura ambiente. A seguir, culturas foram tomadas dessa superfície pelo método da "gase molhada". Foram 3 os tipos de placas utilizadas:

- Placa de Petri, de 15 cm. de diâmetro, contendo ágar-simples, de superfície lisa;
- Placa de Petri, de 15 cm. de diâmetro, contendo ágar-simples, cuja superfície foi tornada rugosa através da gase estéril posta sobre a mesma, imediatamente antes do endurecimento do ágar;
- Placa finamente rugosa de aço inoxidável, medindo 15 cm. de diâmetro.

No paciente: sessenta culturas foram colhidas simultaneamente com "swab" e com "gase molhada", 30 antes e 30 depois de colonização da ferida por bactérias gram-negativas, tendo sido 17 culturas obtidas de um mesmo paciente. Essas culturas, tanto as obtidas com "swab" quanto as obtidas com "gase molhada", foram analisadas qualitativa e quantitativamente.

Vinte e quatro porções de escaras e oito biópsias de tecido foram retiradas de áreas estudadas simultaneamente com "gase molhada". As escaras e os teci-

dos biopsiados foram triturados, após pesagem, e os homogeneizados, analisados qualitativa e quantitativamente.

*

* *

Obtiveram-se culturas de 26 pacientes, todos com queimaduras extensas, cobrindo 25% a 85% da área corporal, e tratados pelo método introduzido por Moyer (22). Consiste êste na aplicação contínua, desde a admissão na unidade de queimados até a cicatrização das feridas, de compressas umedecidas em nitrato de prata a 0,5%.



Resultados

Os dados obtidos neste trabalho serão analisados sob dois aspectos:

- I. O da avaliação do método de cultura quantitativa;
- II. O dos dados clínicos obtidos.

I. - Da avaliação do método da "gase molhada":

O método foi testado de diversas formas, abaixo consideradas:

A - No paciente:

- com "swab";
- com tecido: escaras e biópsias.

B - No laboratório:

- em placa de ágar-liso;
- em placa de ágar-rugoso;
- em placa metálica rugosa.

Da avaliação no paciente com "swab":

Sessenta culturas foram tomadas simultaneamente com "swab" e com "gase molhada", 30 antes da colonização e 30 depois da colonização da queimadura por bactérias gram-negativas; 17 dessas culturas provieram de um mesmo paciente. Das 60 culturas com "swab", 24 foram negativas, 20 antes e 4 depois de colonização da ferida por bactérias gram-negativas. Somente 2 culturas foram negativas com "gase molhada", ambas antes de ocorrer colonização por bactérias gram-negativas.



Do ponto de vista quantitativo os resultados variavam muito mais com "swab" do que com "gase molhada". Demonstram-no os dados obtidos de um paciente onde a evolução clínica transcorreu uniformemente bem, desde a internação na unidade de queimados até a alta hospitalar (fig. 4).

As 36 culturas com "swab", em que houve crescimento, evidenciaram 69 espécies bacterianas. Culturas correspondentes, pelo método da "gase molhada", demonstraram 81 espécies e compreenderam sempre as espécies isoladas com "swab". As bactérias evidenciadas unicamente pelo método da "gase molhada" foram isoladas sempre numa proporção bem menor do que as bactérias predominantes, isoladas com ambos os métodos (fig. 5).

Da avaliação no paciente com tecido:

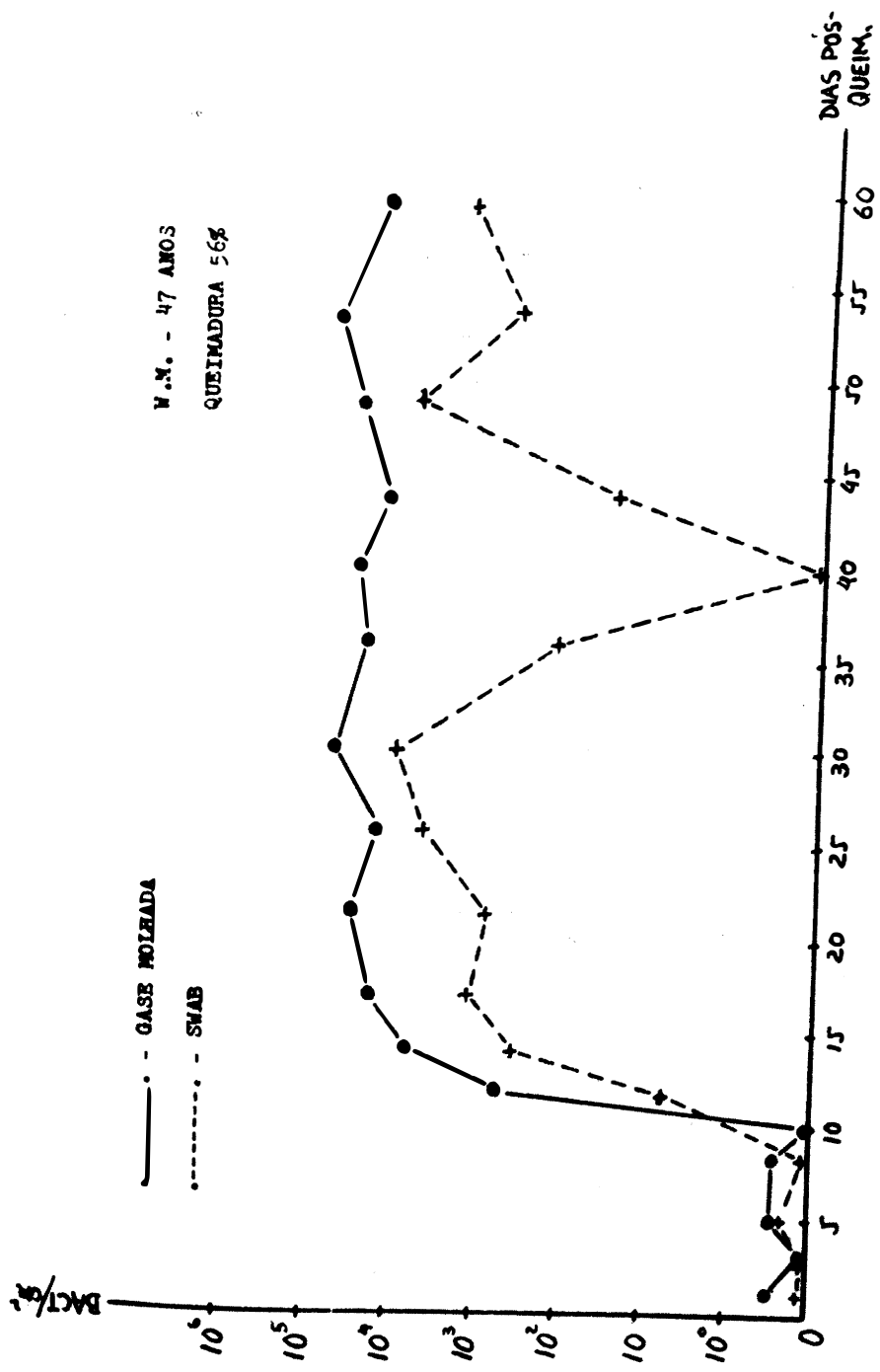
Vinte e quatro culturas de escaras e 8 biópsias teciduais foram feitas simultaneamente e tomadas da mesma área em que se obtiveram culturas pelo método da "gase molhada". Os dados mostraram sempre um paralelismo quantitativo e as espécies identificadas foram sempre as mesmas tanto no tecido como na gase, com exceção de uma cultura de escara onde foi reconhecido a mais um Streptococcus foecalis. (fig. 6).

Da avaliação laboratorial com placas:

O recebimento bacteriano das placas é demonstrado nas figuras 7, 8 e 9. Supõe-se que as bactérias ficaram distribuídas homogêneamente nas placas e que não se multiplicaram durante os 15 minutos de exposição em temperatura ambiente. Os dados evidenciaram um recebimento médio de 28%, 26% e 22%, respectivamente, da placa lisa, da placa rugosa e da placa metálica. Esta percentagem foi calculada em relação à quantidade de bactérias que estiveram na área coberta pela "gase molhada", conforme o exemplo abaixo: dois mililitros de uma cultura com 3×10^8 bactérias por mililitro foram es-

W.M. - 47 ANOS
 QUEIMADURA 56%

— GASE MOLEADA
 - - - SWAB



Culturas	Bactérias	Densidade bacteriana	
		com "swab"	com "gase molhada"
480-B	<i>P. aeruginosa</i>	3 x 10 ³ bact./swab	5 x 10 ⁴ bact/cm ²
	<i>A. aerogenes</i>	5 x 10 ² bact./swab	8 x 10 ³ bact/cm ²
	<i>S. marcescens</i>	—	5 x 10 ² bact/cm ²
520-B	<i>Klebsiella</i> sp.	4 x 10 ⁴ bact./swab	6 x 10 ⁴ bact/cm ²
	<i>Bacillus</i> sp.	—	6 x 10 ² bact/cm ²
532-B	<i>S. foccalis</i>	4 x 10 ⁰ bact./swab	2.4 x 10 bact/cm ²
	<i>S. epidermidis</i>	1 x 10 ⁰ bact./swab	2.4 x 10 bact/cm ²
	<i>Corynebacterium</i> sp.	—	4 x 10 ⁰ bact/cm ²
	<i>Bacillus</i> sp.	—	1 x 10 ⁰ bact/cm ²

Fig. 5 - Exemplos de recebimento bacteriano de feridas queimadas. Culturas tomadas simultaneamente com "swab" e com "gase molhada".



Culturas	Bactérias	Densidade bacteriana	
		em tecido	com "gase molhada"
487-B	P. aeruginosa	6 x 10 ⁴ bact/g.	9.4 x 10 ⁴ bact/cm ²
	A. aerogenes	2 x 10 ² bact/g.	4.2 x 10 ² bact/cm ²
513-B	P. aeruginosa	9.4 x 10 ⁴ bact/g.	7.3 x 10 ⁴ bact/cm ²
	A. aerogenes	2.6 x 10 ⁴ bact/g.	1.4 x 10 ⁴ bact/cm ²
	Klebsiella sp.	8.4 x 10 ³ bact/g.	4.8 x 10 ³ bact/cm ²
547-B	Corynebacterium sp.	6.4 x 10 ⁶ bact/g.	4.6 x 10 ⁶ bact/cm ²
	Bacillus sp.	4 x 10 ⁶ bact/g.	3 x 10 ⁶ bact/cm ²
	S. epidermidis	2 x 10 ⁶ bact/g.	3 x 10 ⁶ bact/cm ²
549-B	Corynebacterium sp.	2.4 x 10 ⁶ bact/g.	3.2 x 10 ⁶ bact/cm ²
	S. foecalis	8 x 10 ⁶ bact/g.	
	Bacillus sp.	3 x 10 ⁶ bact/g.	3 x 10 ⁶ bact/cm ²

Fig. 6 - Exemplos de recebimento bacteriano de feridas queimadas. Culturas tomadas simultaneamente com "gase molhada" e de escaras ou tecido de biópsias.

Exp.	Bactérias	Concentração bacteriana no caldo.	Densidade bacteriana na placa.	Recebimento bacteriano com "gase molhada"	Porcentagem do recebimento
Exp. 48	P. aeruginosa	1.6x10 ⁸ bact/ml.	1.8x10 ⁶ bact/cm ²	4.0x10 ⁵ bact/cm ²	22%
Exp. 49	S. aureus	2.2x10 ⁸ bact/ml.	2.6x10 ⁶ bact/cm ²	8.6x10 ⁵ bact/cm ²	33%
Exp. 50	P. aeruginosa	1.2x10 ⁹ bact/ml.	1.2x10 ⁷ bact/cm ²	4.1x10 ⁶ bact/cm ²	34%
Exp. 51	S. aureus	1.2x10 ⁸ bact/ml.	1.2x10 ⁶ bact/cm ²	3.2x10 ⁵ bact/cm ²	27%
Exp. 52	P. aeruginosa	1.4x10 ⁹ bact/ml.	8.1x10 ⁶ bact/cm ²	2.2x10 ⁶ bact/cm ²	27%
	S. aureus	2.7x10 ⁸ bact/ml.	1.5x10 ⁶ bact/cm ²	3.7x10 ⁵ bact/cm ²	25%
Média: 28%					

Fig. 7 - Recebimento bacteriano de placas com "gase molhada". Placa de ágar-liso.



Exp.	Bactérias	Concentração bacteriana no caldo.	Densidade bacteriana na placa.	Recebimento bacteriano com "gase molhada"	Porcentagem do recebimento
Exp. 53	P. aeruginosa	3.7×10^8 bact/ml.	4.0×10^6 bact/cm ²	1.2×10^6 bact/cm ²	29%
Exp. 54	S. aureus	4.9×10^7 bact/ml.	5.5×10^5 bact/cm ²	1.4×10^5 bact/cm ²	25%
Exp. 55	P. aeruginosa	8.8×10^8 bact/ml.	5.0×10^6 bact/cm ²	1.2×10^6 bact/cm ²	25%
	S. aureus	3.2×10^8 bact/ml.	1.8×10^6 bact/cm ²	3.9×10^5 bact/cm ²	22%
Exp. 56	S. aureus	2.7×10^8 bact/ml.	3.0×10^6 bact/cm ²	9.1×10^5 bact/cm ²	30%
Exp. 57	P. aeruginosa	2.4×10^8 bact/ml.	5.3×10^6 bact/cm ²	1.4×10^6 bact/cm ²	26%

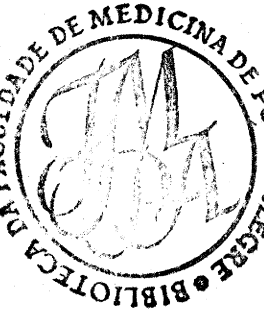
Média: 26%

Fig. 8 - Recebimento bacteriano de placas com "gase molhada". Placa de ágar-rugoso.

Exp.	Bactérias	Concentração bacteriana no caldo.	Densidade bacteriana na placa.	Recebimento bacteriano com "gase molhada"	Porcentagem do recebimento
Exp. 58	S. aureus	1.3×10^8 bact/ml.	1.4×10^6 bact/cm ²	2.5×10^5 bact/cm ²	18%
Exp. 59	P. aeruginosa	2.4×10^9 bact/ml.	1.3×10^7 bact/cm ²	3.0×10^6 bact/cm ²	23%
Exp. 60	S. aureus	4.4×10^8 bact/ml.	2.6×10^6 bact/cm ²	5.2×10^5 bact/cm ²	20%
Exp. 61	S. aureus	1.6×10^8 bact/ml.	1.8×10^6 bact/cm ²	4.5×10^5 bact/cm ²	25%
Exp. 62	P. aeruginosa	8.7×10^8 bact/ml.	9.9×10^6 bact/cm ²	1.9×10^5 bact/cm ²	19%
Exp. 62	P. aeruginosa	1.7×10^9 bact/ml.	5.0×10^6 bact/cm ²	1.3×10^6 bact/cm ²	26%

Média: 22%

Fig. 9 - Recebimento bacteriano de placas com "gase molhada". Placa metálica rugosa.



tendidos sôbre uma placa de 170 centímetros quadrados de área (15 centímetros de diâmetro), onde as bactérias se distribuíram com uma densidade de $3,4 \times 10^6$ bactérias por centímetro quadrado. Ora, se o recebimento pela "gase molhada" foi de $8,5 \times 10^5$ bactérias por centímetro quadrado, corresponde isto a 25% do número total de bactérias existentes na área examinada pelo método da "gase molhada".

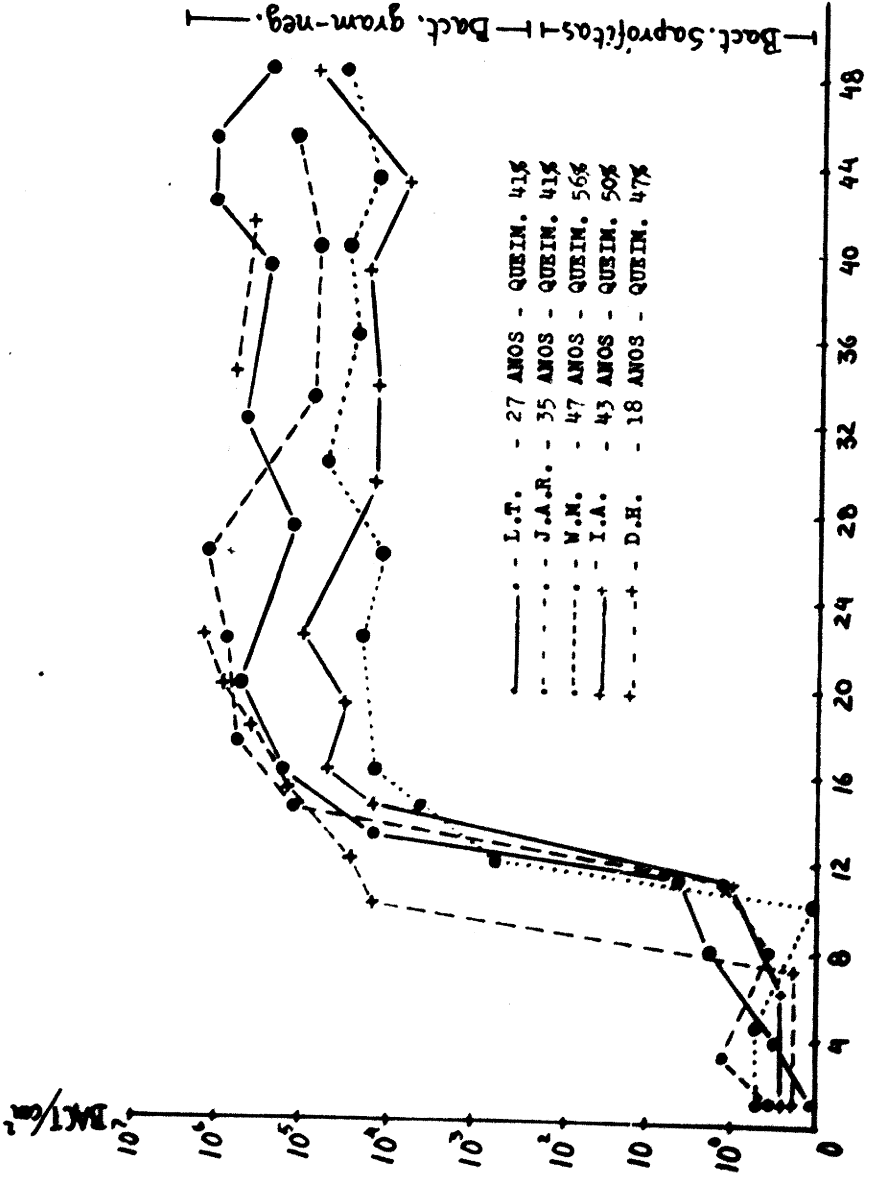
II. - Da avaliação dos dados clínicos obtidos:

Os dados clínicos são considerados separadamente para os grupos A e B de pacientes.

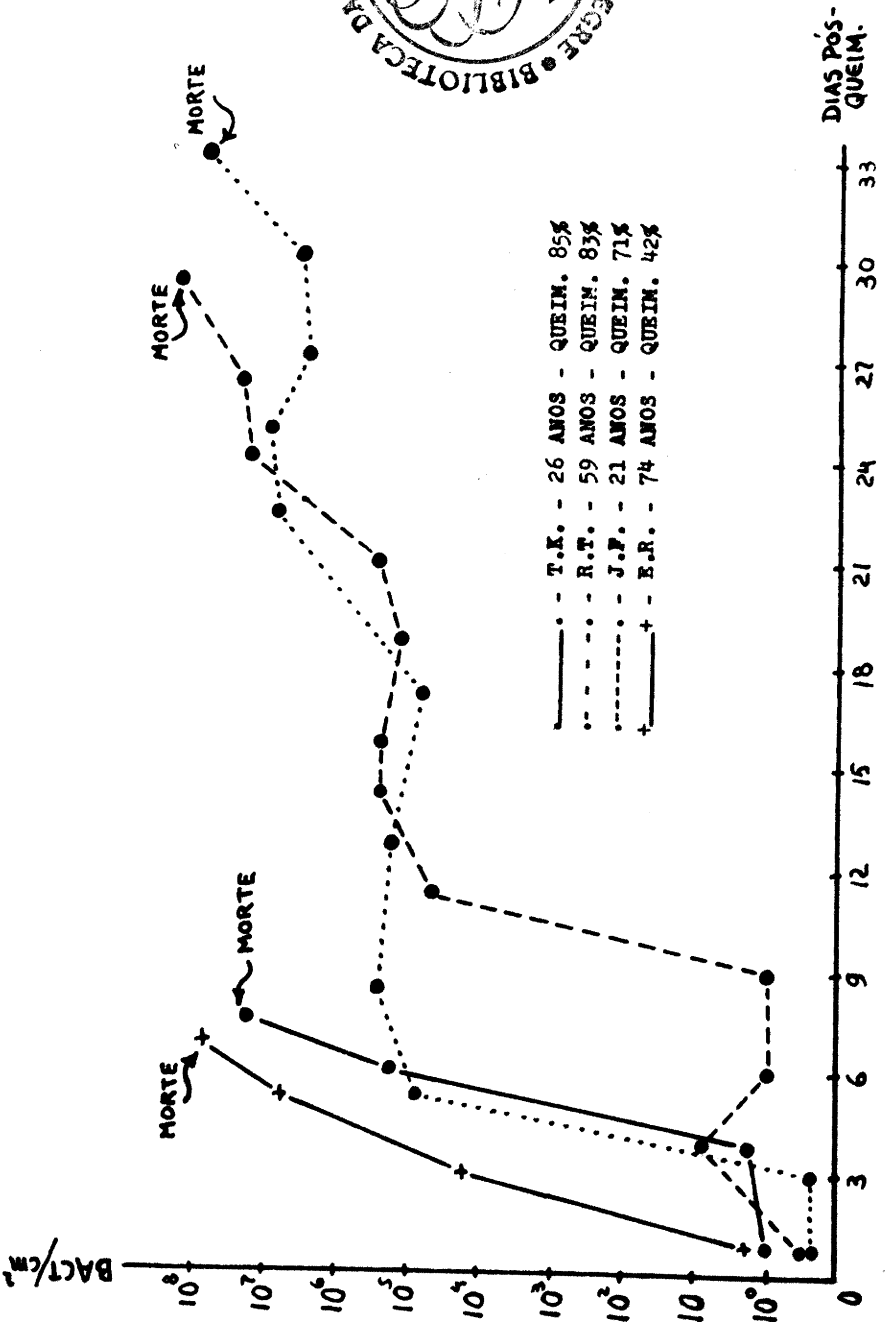
Nos pacientes do Grupo A, tratados "ab initio" com nitrato de prata a 0,5%, bactérias da flora cutânea normal estiveram presentes em número pequeno, que variou de 0 a 10^2 bactérias por centímetro quadrado, por período de 4 a 15 dias, com média de 9,7 dias (fig.10). (6). Depois, súbitamente, a população bacteriana aumentou para níveis de 10^4 a 10^6 por centímetro quadrado, e as bactérias da flora cutânea normal foram sistematicamente substituídas por bactérias gram-negativas. Usualmente, estas foram do grupo Klebsiella-Aerobacter, e raramente, Pseudomonas (6). Esta última espécie ocupou ulteriores em todos menos um dos doentes. A curva exponencial manteve-se nos níveis citados em todos os pacientes que sobreviveram (fig. 11). Nos demais aumentou bruscamente nos dias que precederam a morte (fig. 12).

Cabe aqui frisar que o aumento quantitativo brusco da população bacteriana não condicionou modificações clínicas nem gerais nem nas feridas dos pacientes. Hipertermia, por ventura presente, existira anteriormente (fig. 13). Hemograma não modificou. Apetite permaneceu inalterado ou melhorou.

Em todos os pacientes do Grupo B, as culturas feitas na admissão, evidenciaram elevada concentração de bactérias patogênicas, sendo presenças praticamente constantes o S. aureus e a P. aeruginosa. A densidade



DIAS PÓS-QUEIM.

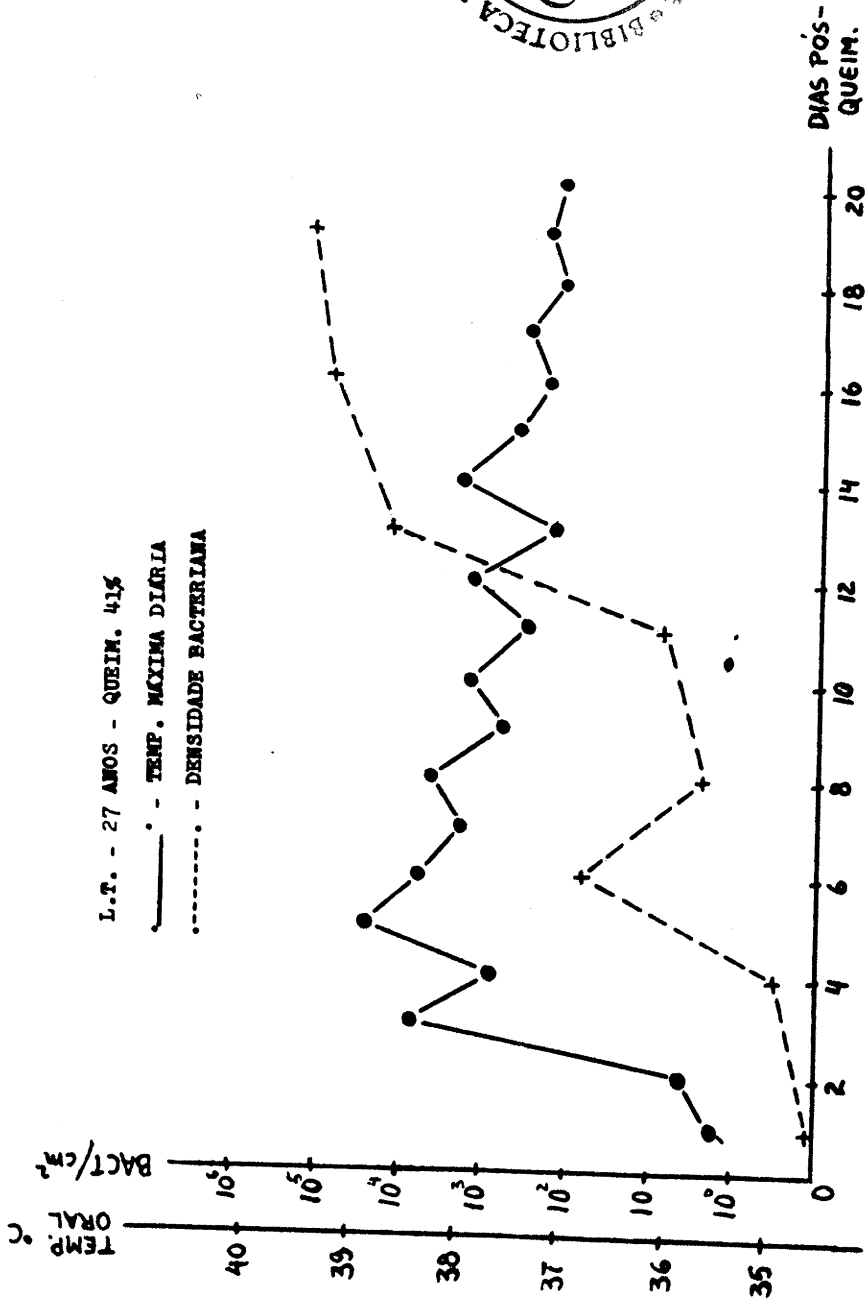




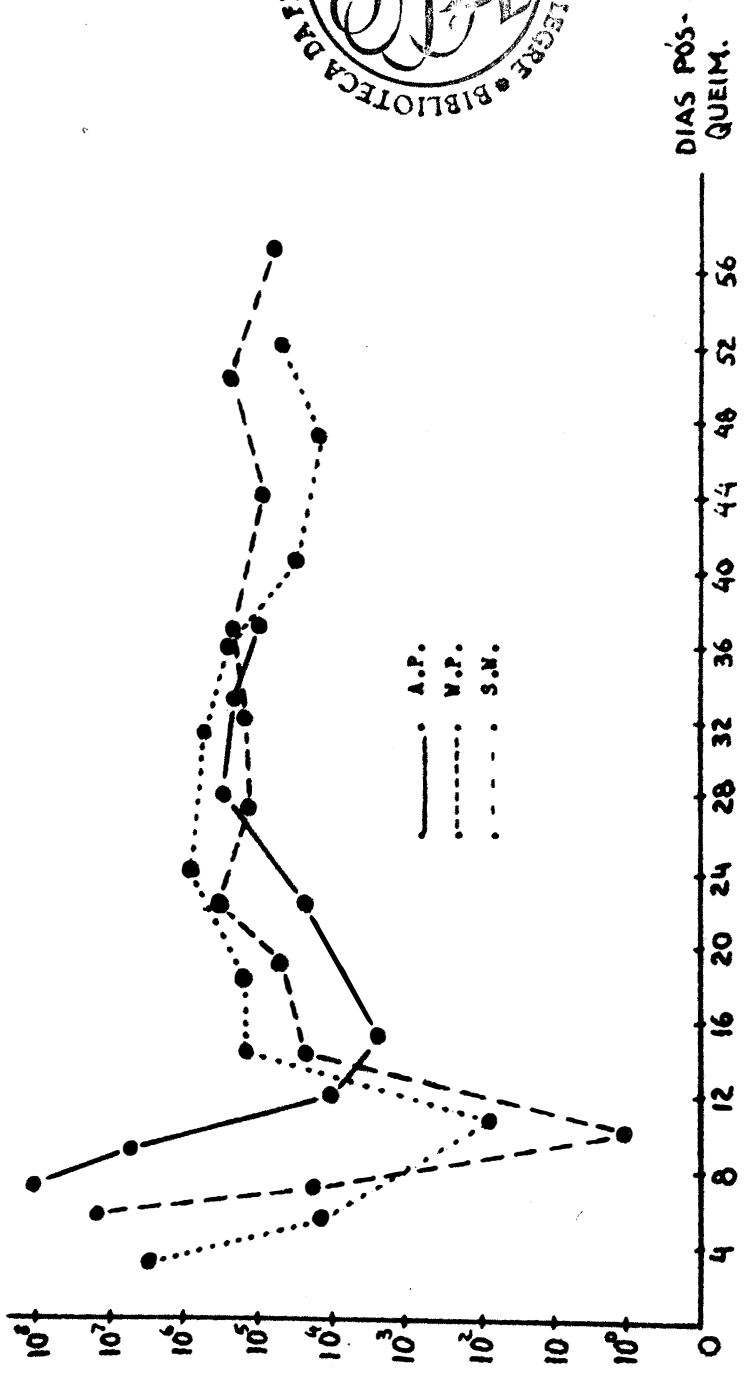
L.S. - 27 ANOS - QUEIM. 41%

—•— TEMP. MÁXIMA DIÁRIA

- - - - - DENSIDADE BACTERIANA



bacteriana diminuiu bruscamente após instituição do tratamento com nitrato de prata e manteve-se depois em concentrações semelhantes às do grupo anterior, onde tratamento fôra instituído "ab initio" (fig. 14). Com o tratamento houve desaparecimento sistemático do S. aureus e permanência de P. aeruginosa, associada ou não com outras bactérias gram-negativas, especialmente do grupo Klebsiella-Aerobacter (6).



Discussão

A infecção constitui um dos problemas fundamentais da grande queimadura. Os vários métodos terapêuticos que tinham a finalidade de, ou evitá-la ou debelá-la, mostravam-se ineficazes (22). Daí o relativo desinteresse em seu estudo. A volta à quimioterapia tópica mostrou-se promissora recentemente. Se não resolveu o problema, diminuiu-lhe a intensidade (19,22). Deu, também, nova ênfase à investigação detalhada da infecção e de seus agentes etiológicos.

*

* *

O significado da quantificação bacteriológica é sobejamente conhecida. A injeção subcutânea de S. aureus pode produzir furúnculo, desde que se introduza um número mínimo de bactérias. Demonstrou-o Elek em "animabobilis" (11). A bacteriologia urinária foi bem estudada, resultando uma sistematização aplicável clinicamente, onde ressalta a importância fundamental da quantificação bacteriana. Concentrações menores do que 10^4 bactérias por mililitro são consideradas simples bacteriúria. Concentrações maiores do que 10^5 bactérias por mililitro, interpretam-se como infecção urinária. Entre esses dois limites paira a dúvida; pode o resultado corresponder tanto a simples contaminação bacteriana quanto a infecção estabelecida (13).

*

* *



Sendo a urina um líquido, é fácil determinar-lhe a concentração bacteriana por unidade de volume. Mas a área queimada é constituída por um meio heterogêneo, contendo exsudação, tecido morto sob forma de escara e tecido não desvitalizado sob forma de tecido de granulação, que contém ou não, ilhas de epitélio em regeneração. Vários métodos têm sido utilizados para fazer a análise quantitativa da população bacteriana de feridas queimadas:

- "swab";
- métodos de contacto;
- homogeneização de escaras;
- homogeneização de biópsias teciduais.

O volume de amostra tomado com "swab" varia muito. A colheita será muito pequena na superfície de escaras firmes, relativamente grande em exsudatos e discreta em tecido de granulação. O método nunca permitiu estudo sistemático uniforme. Os resultados obtidos neste trabalho confirmam-no (fig. 4). Em 24 de 60 culturas não houve evidência de crescimento bacteriano. Em 5 destas culturas negativas havia número elevado de bactérias presentes na ferida queimada.

Os métodos de contacto consistem na aplicação de um meio de cultura sólido sobre uma superfície a examinar, e análise da contaminação da mesma pelo desenvolvimento de colônias bacterianas após incubação. Baseiam-se no princípio teórico de que cada bactéria ou aglomerado bacteriano produz desenvolvimento de uma colônia na superfície do meio sólido. Mas como pode ser muito grande o número de bactérias presentes na ferida queimada, haverá, ou crescimento confluyente na placa, ou as colônias existentes representarão simplesmente grandes conglomerados bacterianos sobre o tecido queimado. Por tais razões os métodos de contacto não quantificam adequadamente as bactérias por unidade de área. Modificações do método, como a "pancake" de Lindberg facilitam a colheita de amostras, mas não fogem do mesmo inconveniente fundamental (17).

O estudo bacteriológico quantitativo de escaras é relacionado à unidade de peso. A análise bacterioló-

gica é feita em homogeneizado proveniente de trituração da escara. A trituração é trabalhosa por causa da firmeza do tecido dérmico; além disso, não é fácil evitar contaminação durante o manuseio. Não há escaras dispostíveis no início do tratamento por não desprenderem, nem tardiamente quando existe só tecido de granulação. Esses aspectos, somados aos problemas técnicos citados, impossibilitam seu uso para uma avaliação bacteriológica de toda a evolução da ferida queimada.

Biópsias de tecido não podem ser feitas com regularidade por motivos óbvios. Seria o mais fidedigno dos métodos se não houvesse o inconveniente da biópsia expor tecidos profundos, sem defesa adequada, à invasão bacteriana.

*

* *



O método da "gase molhada" põe a área a ser cultivada em contacto com um meio líquido onde bactérias flutuam livremente. Uma interfase líquido-gasosa na superfície livre da gase, produz acentuada pressão de capilaridade que atrai pequenas partículas, inclusive bactérias, para a rede da "gase molhada". São atraídas tanto bactérias flageladas quanto não flageladas; a atração das mesmas para dentro da gase faz-se precipuamente por pressão capilar, sendo a motilidade própria das bactérias de importância secundária. Este aspecto ficou bem evidenciado pelo recebimento proporcional de S. aureus, bactérias sem motilidade, e P. aeruginosa, bactérias com motilidade, de placas de Petri com ágar (fig. 7,8,9).

A gase molhada, permanecendo em contacto com a área analisada por tempo suficiente, permite que as bactérias se distribuam com homogeneidade entre o líquido e a superfície queimada. A análise da gase impregnada de bactérias possibilita fazer uma amostragem representativa da área queimada. Quando a gase úmida é posta em

outro meio líquido, como no frasco de Erlenmeyer contendo caldo tripticase-soja, ocorre disseminação inversa das bactérias, da rêde da gase para o meio de cultura. O período de 20 a 30 minutos mantém as bactérias na fase "lag" da curva de reprodução, enquanto elas se distribuem pelo líquido (fig. 3). As contagens feitas reproduzem a concentração de bactérias no líquido analisado, proporcional à concentração que existiu dentro da gase e serão representativas da densidade bacteriana na superfície da ferida queimada.

*

* *



A avaliação do método da "gase molhada", tanto em laboratório quanto em estudos clínicos, atesta sua validade.

A recuperação de bactérias de placas lisa e rugosa evidenciam-no. Vinte e dois a 28% é excelente índice de recuperação bacteriana, pois consideram-se os dados numa função exponencial cuja razão incremental é 10. A análise das curvas exponenciais apresentadas mostra que há insignificante diferença funcional entre $1,5 \times 10^4$ e 6×10^4 bactérias por centímetro quadrado.

A comparabilidade dos dados obtidos com a "gase molhada" e com a trituração de tecido (fig. 6), imprime confiança no método.

Mas é sobretudo a regularidade dos resultados clínicos que valoriza o método da "gase molhada", para o estudo bacteriológico da ferida queimada, durante toda sua evolução. A superfície da queimadura varia muito. É coberta por escara firme e sêca nos dias que seguem ao acidente. A mesma torna-se frável e tende a destacar-se em toda ou em parte de sua espessura. É substituída posteriormente por tecido de granulação ou epitélio em regeneração. A possibilidade de obter culturas comparáveis, dessas diferentes superfícies, ressalta a importância do método, pois que permite a ava-

liação bacteriológica continuada desde o dia do acidente até à epitelização completa da ferida queimada.

*

* *

Durante a evolução clínica desses pacientes observou-se uma aparente tolerância à invasão bacteriana da ferida queimada. A mudança brusca da flora, com acentuado aumento quantitativo da população bacteriana, deixou de produzir quadro séptico que se esperaria pudesse ocorrer. Não cabe neste trabalho procurar interpretação para o fato clínico surpreendente. Ousa-se sugerir, no entanto, a acentuada depressão dos mecanismos imunológicos como fator causal dessa deficiente reatividade orgânica (6, 7).

*

* *



Bactérias da flora cutânea normal, em número discreto, foram demonstrados nas culturas tomadas nos dias subsequentes ao traumatismo térmico. Súbitamente, na evolução desses pacientes, o reconhecimento bacteriológico foi limitado, praticamente, a espécies patogênicas em elevada concentração. Isto pode significar substituição da flora saprofítica por bactérias patogênicas. É bem possível, porém, que as bactérias da flora cutânea normal foram simplesmente obscurecidas pela grande massa de bactérias patogênicas.

*

* *

Os dados bacteriológicos obtidos evidenciaram a eficácia do nitrato de prata como agente anti-bacteriano. Nos doentes do Grupo A, em que o tratamento argírico foi iniciado imediatamente após o acidente térmico, houve retardamento da colonização das feridas queimadas por densas populações de bactérias patogênicas (23). A importância d'êste fato é fundamental porque no grande queimado só ocorre reação inflamatória local durante a segunda ou terceira semanas de evolução da doença (3). Em todos os pacientes do Grupo B, recebidos tardiamente na unidade de queimados, as feridas apresentaram sempre maciça colonização por uma multiplicidade de bactérias patogênicas, incluindo quase sempre S. aureus e P. aeruginosa. Isto contrasta marcadamente com os pacientes do grupo anterior. Mas a eficácia anti-bacteriana do tratamento ficou demonstrada com a diminuição quantitativa brusca produzida nesses pacientes, e pela marcada modificação da flora bacteriana da ferida queimada (fig. 14).





Sumário e Conclusão

O presente trabalho discute um método bacteriológico para determinação quantitativa da flora bacteriana de queimaduras. Propõe-se-lhe a denominação de "gase molhada".

O método consiste na aplicação de uma gase impregnada com solução de cloreto de sódio a 0,9% sobre a ferida queimada, para a qual são atraídas as bactérias por pressão capilar.

A avaliação laboratorial demonstrou que o método é fidedigno e delimitou os detalhes técnicos para a colheita de amostras. O mesmo foi utilizado para estudo bacteriológico sistemático de 26 pacientes portadores de queimaduras extensas, tratados com solução de nitrato de prata a 0,5%. Tem a vantagem, sobre os outros métodos, de ser mais preciso e permitir a análise continuada da ferida queimada durante toda sua evolução, sem prejudicar o doente.

Os resultados demonstrados clinicamente permitiram que se fizesse uma avaliação sistematizada da evolução bacteriológica de queimaduras extensas. Ressalta a substituição brusca de pequena população de bactérias da flora cutânea normal por elevada densidade de bactérias patogênicas, nos dias que seguem ao acidente térmico, sem que haja modificação aparente no quadro clínico apresentado pelos pacientes. Em doentes que morreram houve demonstração de concentração bacteriana extremamente elevada na área queimada, nos dias que precederam a morte.

O método demonstrou, também, a eficiência antibacteriana do nitrato de prata. Houve retardamento na colonização da ferida queimada por população densa de bactérias gram-negativas, quando o tratamento foi instituído precocemente. Nos doentes em que o tratamento argírico foi começado após 48 ou mais horas da queima-

dura, houve diminuição acentuada da população bacteriana da ferida queimada, bem como modificação importante na flora da mesma.





B i b l i o g r a f i a

1. ALEXANDER, J.M. & MONCRIEF, J.A. - Alterations of the immune response following severe thermal injury. Arch. Surg., 93:75, 1966.
2. ALTEMEIER, W.A. - Comunicação pessoal.
3. BIRKE, G.; LILJEDAHN, S.O.; WICKMAN, K. - Studies on burns - VI Bacteriology. Acta. Chir. Scand. Suppl. 259.
4. BREED, R.S.; MURRAY, E.G.D.; SMITH, N.R. - Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. - The Williams & Wilkins, Co., 1957.
5. BRENTANO, L. & GRAVENS, D.L. - Bact. Proceedings, 1966.
6. BRENTANO, L.; GRAVENS, D.L.; MONAFO, W.W.; MOYER, C. A. - Bacteriology of human burns treated with silver nitrate. Arch. Surg., 93:322, 1966.
7. CRUICKSHANK, E. - The bacterial infection of burns. J. Path. & Bact., 41:367, 1935.
8. DECOULX, P.; AMOUDRU, C.; CLAEYS, C.; HAMON, C.; MONOT, G. - La bactériologie des plaies cutanées chez les grands brûlés. Ann. Chir. Plast., 8: 265, 1963.
9. DOWELL, V.R.; HILL, E.O.; ALTEMEIER, W.A. - Use of phenethyl alcohol in media for isolation of anaerobic bacteria. J. Bact., 89:1011, 1966.
10. EDWARDS, P.R. & EWING, W.H. - Identification of Enterobacteriaceae. Burgess Publishing Co., 1962.

11. ELEK, S.D. - Staphylococcus Pyogenes.
vingstone Ltd., 1959.
12. FJELLSTROM, K.E.; ARTURSON, G. - Complement active
serum proteins in clinical burns. Apresentado
no 2º Congresso Internacional de Queimaduras,
realizado em Edimburgh, em 1965.
13. KASS, E.H. - Bacteriuria and the Pathogenesis of
Pyelonephrites. Lab. Invest., 9:110, 1960.
14. KEFALIDES, N.A.; ARANA, J.A.; BAZAN, A.; VELARDE,
N.; ROSENTHAL, S.M. - Evaluation of antibiotic
prophylaxis and gamma-globulin, plasma, albumin
and saline-solution in severe burns. Bacterio-
logic and immunologic studies. Ann. Surg., 159:
496, 1964.
15. KORLOF, B. - Infection of burns. Acta. Chir. Scand.
Suppl., 209, 1956.
16. LANCHANTIN, G.F. & DEADNICK, R.E. - Serum protein
changes in thermal trauma. I Electrophoretic
analysis at pH 8,6. J. Clin. Invest., 37:1736,
1958.
17. LINDBERG, R.B. - Bact. Proceedings, 1965.
18. MARKLEY, K.; GURMENDI, G.; MORI-CHAVEZ, P.; BAZAN,
A. - Fatal Pseudomonas septicemia in burned pa-
tients. Ann. Surg., 145; 175, 1957.
19. MONCRIEF, J.A.; LINDBERG, R.B.; SWITZER, W.E. & col.
Use of topical antibacterial therapy in the
treatment of the burn wound. Arch. Surg., 92:
558, 1966.
20. MONCRIEF, J.A. & TEPLITZ, C. - Changing concepts in
burn sepsis. J. Trauma., 4:233, 1964.
21. MOYER, C.A. - Some effects of 0,5% silver nitrate
and high humidity upon the illness associated
with large burns. J. Nat. Med. Ass., 37:95, 1955.



22. MOYER, C.A.; BRENTANO, L.; GRAVENS, D.L.; MARGRAF, H.W.; MONAFO, W.W. - Treatment of large human burns with 0,5% silver nitrate solution. Arch. Surg., 90:812, 1965.
23. ORDER, E.S.; MASON, A.D.; WALKER, H.L.; LINDBERG, R.F.; SWITZER, W.E.; MONCRIEF, J.A. - The pathogenesis of second and third degree burns and conversion to full thickness injury. Surg., Gyn. & Obst., 120:983, 1965.
24. PEACOCK, E.E. - What's new in Surgery. Tissue transplantation and plastic surgery. Surg., Gyn. & Obst., 122:290, 1966.
25. RUSSO, A.C. - Queimaduras. Livraria Luso-Espanhola e Brasileira, Rio de Janeiro, 1959.
26. THAL, A.P. - What's new in surgery. Shock and metabolism. Surg., Gyn. & Obst., 122:283, 1966.
27. TORRES PEREIRA, A. - A contribuição da bacteriologia para o problema das queimaduras. J. Soc. Cienc. Med. 129:408, 1962.
28. TUMBUSCH, W.T.; VOGEL, E.H.; BUTKIEWICZ, J.V.; GRABER, C.D.; LARSON, D.L.; MITCEL, E.R. - Septicemia in burn injury. J. Trauma., 1:22, 1961.
29. WILSON, G.S. & MILLER, A.A. - Topley and Wilson's principles of bacteriology and immunity. Edward Arnold Publishers Ltd., 5^a Ed., 1964.

