

EFEITO DE DIFERENTES GASES SOBRE O CRESCIMENTO BACTERIANO. ESTUDO EXPERIMENTAL “*IN VITRO*”

EFFECT OF DIFFERENT GASES ON BACTERIAL GROWTH. EXPERIMENTAL STUDY “*IN VITRO*”

Marcelo Monteiro Sad Pereira, TCBC-SP¹; Alessandra Navarini²; Lúcia M. J. Mímica³; Adhemar Monteiro Pacheco Jr., TCBC-SP⁴; Rodrigo Altenfelder Silva, TCBC-SP⁵

RESUMO: Objetivos: Criar um modelo experimental *in vitro* para estudar isolada e controladamente o efeito direto de alguns gases utilizados em vídeo-laparoscopia sobre o crescimento bacteriano, além de compará-los ao efeito do ozônio, um gás sabidamente bactericida. **Método:** Exposição de grupos de quinze laminocultivos do tipo URIBAC (Probac do Brasil, São Paulo/Brasil), semeados com uma de três cepas das seguintes bactérias: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Staphylococcus aureus*. A concentração utilizada de bactéria foi de 10⁴ ufc/ml, o tempo de exposição foi de uma hora, o fluxo dos gases e a pressão foram mantidos constantes em 2L/m e 11 mmHg, respectivamente. Os gases utilizados foram o dióxido de carbono e o hélio na concentração de 99,99% para ambos, o ozônio a 0,4% e ar comprimido como controle. Foram também deixados um grupo de quatro placas de cada bactéria sem exposição aos gases como um controle da técnica de diluição. A leitura foi realizada após vinte e quatro horas em estufa. **Resultados:** O ozônio promoveu esterilização de 100% dos laminocultivos; os demais gases não alteraram significativamente nenhuma das culturas em relação aos controles. **Conclusões:** O modelo de exposição criado é prático e eficiente. Os gases atualmente utilizados para a realização do pneumoperitônio não apresentam efeito bactericida significativo sobre as bactérias testadas. O Ozônio tem efeito bactericida superior aos demais gases estudados (*Rev. Col. Bras. Cir.* 2005; 32(1): 12-14).

Descritores: Ozônio; Gases- Uso terapêutico; Gases- Administração & dosagem; Crescimento bacteriano.

INTRODUÇÃO

O advento da vídeo-laparoscopia como opção diagnóstica e terapêutica gerou questionamentos quanto à sua viabilidade e segurança em diversas situações clínicas, particularmente em doentes portadores de infecção peritonial.

Resultados conflitantes de estudos clínicos^{1,2} e mesmo experimentais³⁻⁹ chamaram a atenção da presença de diferentes variáveis envolvidas no binômio vídeo-laparoscopia e peritonite. A defesa humoral, peritoneal e sistêmica e a sua interação com o pneumoperitônio induzido, o tempo de instalação da peritonite, a gravidade dos pacientes, assim como diferenças entre os gases utilizados em vídeo-cirurgia, além de outros fatores, poderiam explicar a heterogeneidade dos resultados. Salienta-se com isso a importância da investigação experimental para isolar cada uma destas variáveis e chegar a resultados mais conclusivos ou pelo menos de mais fácil interpretação.

Além do dióxido de carbono e do hélio, habitualmente utilizados em vídeo-laparoscopia existem outros gases medicinais, ainda não aproveitados em cirurgias, mas usados com finalidade terapêutica em outras situações. Exemplos destes são a hiperoxigenação de tecidos infectados em câmaras hiperbáricas e o uso do ozônio. A incorporação de alguns

destes gases à prática da vídeo-laparoscopia poderia trazer benefícios importantes, além de promover maior segurança da sua utilização na vigência de peritonite.

Os objetivos deste trabalho são:

- 1 - Criar um modelo de exposição de bactérias à gases.
- 2 - Analisar os efeitos de gases já utilizados em vídeo-cirurgia como o dióxido de carbono e o hélio sobre o crescimento bacteriano.
- 3 - Comparar o efeito daqueles gases ao ozônio.

MÉTODO

O trabalho foi realizado na Unidade de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental (UTECE) do Departamento de Cirurgia e na Disciplina de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo.

Foram utilizadas as seguintes cepas bacterianas: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Cada uma das três cepas foi semeada em quinze laminocultivos do tipo URIBAC^â (Probac do Brasil, São Paulo/SP) e expostas logo em seguida a quatro diferentes tipos de gases: ar comprimido, dióxido de carbono (CO₂), hélio (He)

1. Mestre em Medicina pela Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo.
2. Bióloga da Disciplina de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo.
3. Mestre e Doutora; Professora Adjunta; Chefe da Disciplina de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas de Santa Casa de São Paulo.
4. Mestre e Doutor; Professor Adjunto do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo e Chefe da Área de Vias Biliares e Pâncreas do Departamento de Cirurgia da FCMSC-SP.
5. Mestre e Doutor; Professor Adjunto do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo e Chefe do Serviço de Emergência do Hospital São Luiz Gonzaga da Santa Casa de São Paulo.

Recebido em 02/06/2004

Aceito para publicação em 31/08/2004

Trabalho realizado na Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo.

Tabela 1 - Média aritmética (MA) dos resultados em unidades formadoras de colônias por mililitros (ufc/ml) das culturas de *E. coli* expostas ao dióxido de carbono (CO₂), hélio (He), ozônio (O₃) e ar comprimido (AC) e comparação destas aos controles sem exposição a gases (C).

| | MA | C |
|-----------------|-----------------|-----------------|
| CO ₂ | 10 ² | 10 ² |
| He | 10 ² | 10 ² |
| O ₃ | 0 | 10 ² |
| AC | 10 ² | 10 ² |

Fonte: Disciplina de Microbiologia – FCMSC-SP.

e ozônio(O₃). Além destes, foram semeados mais quatro laminocultivos de cada cepa, sem expô-los a nenhum gás, utilizados apenas como controle do crescimento das bactérias.

A concentração das bactérias utilizada foi de 10⁴ unidades formadoras de colônias por mililitros (ufc/ml) e o tempo de exposição aos gases foi de uma hora. Imediatamente após a exposição eram colocadas em estufa a 37°C por vinte e quatro horas, e realizada a leitura qualitativa e quantitativa das culturas no dia seguinte. Nos casos de leitura negativa para crescimento bacteriano, os laminocultivos eram recolocados na estufa por mais vinte e quatro horas para confirmar esta negatividade.

As concentrações dos gases utilizadas foram: dióxido de carbono 99,99%; hélio 99,99%; ozônio 0,4% (99,6% restante de oxigênio) e ar comprimido (21% oxigênio e 79% nitrogênio).

O sistema de exposição aos gases foi por nós idealizado e confeccionado, utilizando cilindro de inox de 15cm de diâmetro por 30cm de comprimento, o que permitia acondicionar quinze laminocultivos por ensaio. A temperatura do cilindro era aferida continuamente durante os ensaios através de termômetro digital. O fluxo dos gases através do cilindro e a pressão interna do sistema eram mantidos continuamente em 2 litros/min e 11 mm/hg, respectivamente.

Foi considerado como padrão de inibição de crescimento bacteriano a redução maior ou igual a duas casas decimais na média aritmética das culturas quantitativas das bactérias expostas e não expostas aos gases.

Tabela 2 - Média aritmética (MA) dos resultados em ufc/ml das culturas quantitativas de *S. aureus* expostas ao dióxido de carbono (CO₂), hélio (He), ozônio (O₃) e ar comprimido (AC) e comparação destas aos controles (C) sem exposição a gases.

| | MA | C |
|-----------------|-----------------|-----------------|
| CO ₂ | 10 ⁵ | 10 ⁵ |
| He | 10 ⁵ | 10 ⁵ |
| O ₃ | 0 | 10 ⁵ |
| AC | 10 ⁵ | 10 ⁵ |

Fonte: Disciplina de Microbiologia – FCMSC-SP.

Devido a linearidade dos resultados não foi necessária análise estatística.

RESULTADOS

Os resultados das culturas estão demonstrados nas Tabelas 1, 2 e 3:

DISCUSSÃO

Apesar da ampla utilização da vídeo-laparoscopia há mais de uma década, ainda hoje muitos questionamentos persistem quanto aos efeitos do pneumoperitônio sobre o paciente cirúrgico. Particularmente na presença de peritonite, a prática clínica da vídeo- cirurgia ^{1,2} e até estudos experimentais *in vivo*³⁻⁹, produziram resultados controversos quanto à segurança da sua utilização e à sua influência sobre as defesas peritoneais e sistêmicas, além do seu efeito sobre o crescimento bacteriano.

Propusemos neste estudo então um modelo experimental original para estudar especificamente a influência de gases já utilizados em vídeo cirurgia (CO₂ e hélio) e também compará-los e introduzir o ozônio, que têm propriedades bactericidas. Tal estudo é o ponto de partida de uma linha de pesquisa que visa futuramente a utilização do ozônio em vídeo-cirurgia de pacientes com peritonite. Assim, além de por fim a discussão sobre a segurança da indução de pneumoperitônio nestes pacientes, o gás participaria da terapêutica da peritonite.

Os resultados encontrados neste estudo foram bastante homogêneos dentro de cada um dos ensaios, demonstrando assim ser adequado o sistema de exposição proposto. Conseguimos um estudo verdadeiramente controlado. Por outro lado identificamos dois grupos de gases distintos, o primeiro de pouca influência sobre o crescimento bacteriano, o segundo de grande inibição de crescimento. No primeiro grupo encontram-se o ar comprimido, o dióxido de carbono e o hélio, no segundo o ozônio.

Mantivemos controles das bactérias sem exposição aos gases justamente para confirmar a viabilidade das cepas e a diluição obtida, evitando assim conclusões errôneas.

Os resultados das culturas expostas aos gases foram coerentes com os controles respectivos. As diferenças entre as concentrações de *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* expos-

Tabela 3 - Média aritmética (MA) dos resultados em ufc/ml das culturas quantitativas de *P. aeruginosa* expostas ao dióxido de carbono (CO₂), hélio (He), ozônio (O₃) e ar comprimido (AC) e comparação destas aos controles (C) sem exposição a gases.

| | MA | C |
|-----------------|---------------------|----------------------|
| CO ₂ | 6,4x10 ² | 7,75x10 ³ |
| He | 7,6x10 ² | 7,75x10 ³ |
| O ₃ | 0 | 7,75x10 ³ |
| AC | 9,4x10 ² | 7,75x10 ³ |

Fonte: Disciplina de Microbiologia – FCMSC-SP.

tas ao hélio, ao dióxido de carbono e ao ar comprimido foram menores que duas casas decimais ou iguais aos controles. Assim, mesmo com possíveis variações no preparo das bactérias, conseguimos concluir que estes gases não influenciaram o crescimento bacteriano.

No caso do ozônio, não houve crescimento bacteriano algum das cepas expostas, mesmo com a concentração dos controles não expostos tendo variado de 10^3 a 10^5 ufc/ml. Assim, concluímos ser este o único inibidor de crescimento bacteriano entre os gases testados.

Os resultados homogêneos também tornaram desnecessária a análise estatística pois o ozônio mostrou-se inibidor do crescimento bacteriano em 100% dos experimentos e os demais gases em 0%.

Em nenhum dos experimentos houve contaminação por bactérias não semeadas. Ao final dos ensaios, o método de identificação de bactérias nos URIBAC[®] mostrou-se eficiente e simples em sua execução.

É importante salientar que testamos um número restrito de bactérias muito inferior ao universo de agentes infec-

ciosos existentes. Deverão ser testadas doses menores de ozônio em períodos mais curtos, para que possamos avaliar o seu efeito bactericida.

Como dito anteriormente, a ozonização da cavidade é uma idéia inovadora para o tratamento de peritonites sem registro prévio em literatura. Porém, para comprovarmos a sua eficácia clínica, estudos subseqüentes deverão comparar seu efeito aos efeitos *in vivo* dos demais gases utilizados em videolaparoscopia.

As condições do presente trabalho nos permitem concluir:

1) O sistema criado de exposição de bactérias a gases mostrou-se prático e eficiente para realização dos testes propostos.

2) O dióxido de carbono e o hélio, atualmente utilizados em vídeo cirurgia, não possuem efeito direto significativo sobre o crescimento das bactérias testadas.

3) O ozônio é um potente inibidor do crescimento bacteriano, sendo este efeito muito superior ao dos demais gases testados.

ABSTRACT

Background: Our aim was to create an "in vitro" experimental model to study the direct effect of some gases used in videolaparoscopy, on bacterial growth, and compare them to the effect of ozone, a bactericidal gas. **Methods:** We performed some assays with display of fifteen slide cultures of URIBAC type (Probac do Brasil, São Paulo- Brasil) sown with one of the three strains of different bacteria: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Bacterial concentration was 10^4 ufc/ml. Exposure time was of one hour, with the flux of gases and the pressure kept constant in 2L/mm and 11mmHg, respectively. The used gases were carbon dioxide and helium, in a concentration of 99,99% for both, ozone 0.4% and compressed air as control. A group of four boards of each bacteria was left without display to the gases as a control for the dilution technique. The reading was carried through twenty four hours in incubator. **Results:** The ozone promoted sterilization of 100% of the slide culture; the other gases did not promote significant changes in any of the slide cultures exposed to them, including controls. **Conclusions:** The expository model bred is practical and efficient. The gases currently used do no exert direct effect up on the tested bacteria. The ozone has a high bacterial effect, much greater than the other gases.

Key words: Ozone; Gases- therapeutic use; Gases- Administration & dosage; Bacterial growth.

REFERÊNCIAS

1. Benoit J, Cruaud P, Lauroy J, et al. - Le traitement laparoscopique des infections abdominales g n re-t-il les bact ri mies? Etude prospective: 75 cas. J Chir, 1995,132(12):472-477.
2. Druart ML, van Hee R, Etienne J, et al. - Laparoscopic repair of perforated duodenal ulcer. A prospective multicenter clinical trial. Surg Endosc, 1997,11(10):1017-1020
3. Gurtner GC, Robertson CS, Chung CS, et al. - Effect of carbon dioxide pneumoperitoneum on bacteraemia and endotoxaemia in the animal model of peritonitis. Br J Surg, 1995,82(6):844-848.
4. Silva FCS. Análise da concentra o sanguínea de bactérias durante insufla o peritoneal com dióxido de carbono em cães com peritonite bacteriana. Disserta o (Doutorado). São Paulo. Universidade de São Paulo, 1997.
5. Casaroli AA. Repercussão do pneumoperitônio e da ventila o controlada sobre a depura o linfática peritoneal de bactérias. Estudo experimental em ratos. Disserta o (Doutorado). São Paulo. Universidade de São Paulo, 1999.
6. Evasovich MR, Clark TC, Horattas MC, et al. - Does pneumoperitoneum during laparoscopy increase bacterial translocation? Surg Endosc, 1996,10(12):1176-1179.
7. Bustos B, G mez-Ferrer F, Baliq e JG, et al. - Laparoscopy and septic dissemination caused by perioperative perforation of the occluded small bowel: na experimental study. Surg Laparosc Endosc, 1997,7(3):228-231.
8. Sare M, Yesilada O, G rel M, et al. - Effects of CO₂ insufflation on bacterial growth in rats with *Escherichia coli* - induced experimental peritonitis. Surg Laparosc Endosc, 1997,7(1):38-41.
9. Rodrigues JMS. Avalia o da resposta inflamatória aguda dos macrófagos peritoneais após a insufla o com o dióxido de carbono. Disserta o (Doutorado). São Paulo. Universidade de São Paulo, 2000.

Endereço para correspondência:
 Marcelo Monteiro Sad Pereira
 Rua Oscar Cassali, 20
 12516-370 - Guaratinguetá-SP
 Email: gastroclinicagta@uol.com.br