

Crescimento bacteriano em perfluorocarbonos líquidos: estudo “in vitro”

Bacterial growth in perfluorocarbon liquids: an in vitro study

Leciana Rorato Chiconelli Vanzo¹
Agostinho Bryk Junior²
Maria Claudia Gomes Komatsu²
Carlos Augusto Moreira Junior³

RESUMO

Objetivo: Verificar o crescimento de *P. aeruginosa* e *S. aureus* em perfluorooctano líquido (PFO). **Métodos:** Utilizaram-se três meios de cultura: PFO, caldo de digestão de soja e caseína e solução salina a 0,9%. Dividiram-se 5 ml de PFO em frascos contendo 1 ml cada. Nos frascos 1 e 2 inoculou-se 1 colônia inteira de *P. aeruginosa* e nos recipientes 3 e 4 a mesma quantidade de *S. aureus*. O frasco 5 serviu como controle sem sofrer contaminação. Inoculou-se também 1 colônia de cada bactéria em 1 ml dos demais meios de cultura. As soluções foram mantidas em incubadora a 37°C por 10 dias. Em câmara de fluxo laminar realizou-se o repique utilizando-se alça calibrada de 1:1000 no tempo zero, 72 h, 168 h e 240 h após contaminação. Verificou-se o crescimento bacteriano por meio da contagem de colônias em placas de agar sangue 24 h após cada repique. **Resultados:** Houve crescimento de *P. aeruginosa* e *S. aureus* no tempo zero em todos os meios, confirmando a inoculação bacteriana. Nas horas seguintes o crescimento não mais foi observado em PFO. Ambas as bactérias desenvolveram-se abundantemente nos demais meios de cultura em todos os tempos. No frasco controle não houve crescimento bacteriano. **Conclusão:** Os resultados demonstram que o PFO não representa meio favorável para o crescimento bacteriano.

Descritores: Crescimento bacteriano; Fluorocarbonetos; Contaminação bacteriana ocular; *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus aureus*

INTRODUÇÃO

Desde os primeiros relatos de uso de perfluorocarbonos líquidos (PFCL) na cirurgia vítreo-retiniana, a partir de 1987 com os trabalhos de Chang e col.⁽¹⁻⁵⁾, é cada vez mais difundido seu uso entre os cirurgiões de retina.

Essas substâncias mostraram-se úteis por apresentarem propriedades físico-químicas favoráveis ao bom desempenho do ato cirúrgico⁽⁶⁾, possibilitando conforto e segurança ao cirurgião tanto na sua administração quanto na sua remoção ao final da intervenção cirúrgica. No entanto, não é rara a permanência de pequenas quantidades de PFCL (bolhas ou gotículas)⁽⁷⁾ dentro da cavidade vítrea após o término da cirurgia.

A permanência de uma substância estranha na cavidade vítrea poderia representar um meio de cultura para a proliferação bacteriana, ocasionando assim uma infecção grave e de tratamento complicado, pois há dificuldade de se manter concentrações terapêuticas de antibióticos na cavidade vítrea por tempo adequado⁽⁸⁾. Desta forma é importante verificar o potencial de

Trabalho realizado no Serviço de Oftalmologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

¹ Médica Residente em Oftalmologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

² Acadêmicos do 5º ano de Medicina da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Paraná.

³ Professor Titular de Oftalmologia da Universidade Federal do Paraná.

Os autores declaram não possuir interesse financeiro no desenvolvimento ou marketing de qualquer instrumento ou substância referidos no estudo.

Endereço para correspondência: Maria Claudia Gomes Komatsu - R. Alferes Poli, 271 - Curitiba (PR) CEP 80230-090. E-mail: mailto:dragu@cwb.matrix.com.br

contaminação dos PFCL. Inúmeras pesquisas demonstram que os agentes patogênicos mais comuns nas infecções intra-oculares são *S. aureus* e *P. aeruginosa*⁽⁸⁻¹²⁾.

O objetivo do presente estudo foi verificar o crescimento de *S. aureus* e *P. aeruginosa* em perfluorooctano (PFO), um dos PFCL mais utilizados na cirurgia vítreo-retiniana⁽⁶⁾.

MÉTODOS

Os perfluoroquímicos líquidos são compostos pertencentes a uma classe de oligômeros do óxido de perfluoropropileno purificados. Apresentam excelente estabilidade química e térmica em virtude de suas conformações estruturais de carbono, oxigênio e flúor. Os perfluorocarbonos líquidos (PFCL) geralmente apresentam as seguintes propriedades: são imiscíveis com a água^(6,13), transparentes, incolores, inertes quimicamente, inodoros, não são inflamáveis, possuem baixa viscosidade, insolubilidade em solventes orgânicos e alta gravidade específica⁽¹⁴⁾.

Esses compostos são opticamente transparentes sendo seu índice de refração semelhante ao do corpo vítreo normal, ou seja, 1,29, o que permite uma fácil observação intra-ocular durante manobras per-operatórias⁽¹³⁾.

A baixa viscosidade de 2 a 3 centistokes a 25°C⁽¹³⁾ bem como a insolubilidade em solventes orgânicos convencionais⁽¹⁴⁾ representam outras propriedades favoráveis desses compostos.

Utilizaram-se três meios de cultura: PFO, caldo de digestão de soja e caseína (TSB) e solução salina a 0,9% (SS).

Dividiram-se 5 ml de PFO em frascos contendo 1 ml, identificados pela numeração de 1 a 5. Nos frascos 1 e 2 inoculou-se uma colônia inteira de *P. aeruginosa* (ATCC 27853) e nos recipientes 3 e 4 a mesma quantidade de *S. aureus* (ATCC 25923). O frasco 5 serviu de controle sem sofrer contaminação. A utilização de colônias bacterianas inteiras se deve ao fato do PFO ser imiscível em água.

Com o objetivo de se verificar a viabilidade dos microrganismos, inoculou-se separadamente uma colônia de cada bactéria em frascos contendo 1 ml de TSB, um meio de cultura rico em nutrientes favoráveis à proliferação bacteriana.

Repetiu-se o mesmo procedimento para a contaminação da solução salina a 0,9%, a fim de se comparar os resultados do PFO com outro meio que não possui nutrientes.

Todas as soluções foram homogeneizadas em Vortex a 1000 rpm e, posteriormente, mantidas em uma incubadora a 37°C por 10 dias.

Realizou-se o repique utilizando-se uma alça calibrada de 1:1000 no tempo zero, 72 horas, 168 horas e 240 horas após a contaminação. Efetuou-se toda a manipulação do material em uma câmara de fluxo laminar a fim de evitar contaminação externa.

Verificou-se o crescimento bacteriano através da contagem de colônias em placas de agar sangue 24 h após cada repique.

RESULTADOS

Observou-se o crescimento de 1 colônia e 3 colônias de *P. aeruginosa* nos frascos 1 e 2, respectivamente. No entanto, nos demais tempos de aferição não se detectou nenhum desenvolvimento dessa bactéria em PFO. Já nos meios TSB e SS o crescimento foi abundante em todos os tempos conforme a tabela 1.

Constatou-se no tempo zero a presença de 01 colônia e de 16 colônias de *S. aureus* nas amostras 3 e 4, respectivamente. Nas horas seguintes o crescimento desse microrganismo não mais foi observado em PFO. Com o passar do tempo houve um decréscimo no desenvolvimento do estafilococo em TSB e SS, no entanto o crescimento mesmo assim foi abundante (Tabela 2).

No frasco 5, controle não contaminado, não houve proliferação bacteriana em nenhum dos tempos.

DISCUSSÃO

O maior crescimento bacteriano se deu em caldo de digestão de soja e caseína por se tratar de um meio de cultura próprio para o desenvolvimento bacteriano.

Embora a *P. aeruginosa* seja um microrganismo muito resistente, capaz de se desenvolver até em meios extremamente desfavoráveis, não se observou seu crescimento em nenhuma

Tabela 1. Quantificação do crescimento de *P. aeruginosa* (ATCC 27853) em diferentes meios de cultura

Tempo (horas)	Número de colônias			
	PFO		TSB	SS
	Frasco 1	Frasco 2		
0	1	3	Abundante ++++/IV	++++/IV
72	0	0	Abundante ++++/IV	++++/IV
168	0	0	Abundante ++++/IV	+++/IV
240	0	0	Abundante +++/IV	+++/IV

Tabela 2. Quantificação do crescimento de *S. aureus* (ATCC 25923) em diferentes meios de cultura

Tempo (horas)	Número de colônias			
	PFO		TSB	SS
	Frasco 3	Frasco 4		
0	1	16	Abundante ++++/IV	++++/IV
72	0	0	Abundante ++++/IV	++++/IV
168	0	0	Abundante ++++/IV	+++/IV
240	0	0	Abundante ++++/IV	++/IV

das amostras de PFO em estudo, com exceção daquelas do tempo zero, que correspondem ao momento da inoculação do germe. Somente a falta de nutrientes não explicaria adequadamente a ausência de crescimento dessa bactéria, porque demonstramos que mesmo em solução salina a 0,9% essa cresceu abundantemente.

Não houve crescimento de *S. aureus* em PFO, exceto no tempo zero quando se observou o crescimento de 01 colônia na primeira amostra e de 16 colônias na segunda. Em solução salina a 0,9%, o desenvolvimento do estafilococo foi abundante, no entanto houve um pequeno decréscimo a partir de 168 horas (7 dias).

Na amostra de PFO utilizada como controle não contaminado, não ocorreu proliferação de nenhuma bactéria, demonstrando que o PFO em uso era um produto estéril além de não ter ocorrido contaminação externa durante a manipulação da substância.

Os resultados deste estudo "in vitro" demonstraram que o PFO não representa um meio favorável para o crescimento bacteriano.

ABSTRACT

Purpose: To determine the growth of *P. aeruginosa* and *S. aureus* in liquid perfluorooctane (PFO). **Methods:** Three culture media were used: PFO, soy and casein digestion broth and 0.9% saline solution. Five ml PFO were distributed to 1 ml flasks. Flasks 1 and 2 were inoculated with 1 entire colony of *P. aeruginosa* and flasks 3 and 4 were inoculated with the same amount of *S. aureus*. Flask 5 served as control without any contamination. One colony of each bacterium was also inoculated in 1 ml of the remaining culture media. All solutions were kept in an incubator at 37° C for 10 days. The cultures were replated under a laminar flow hood using a calibrated 1:1000 loop at times zero, 72 h, 168 h and 240 h after contamination. Bacterial growth was determined by counting the colonies on blood agar plates 24 hours after each replating. **Results:** Time zero demonstrated bacterial growth in all media, confirming inoculation. During the subsequent hours no further growth of these microorganisms was observed in PFO. Both bacteria developed abundantly in the remaining culture media at all times studied. The control flask did not show any bacterial growth. **Conclusions:** The results show that PFO does not represent a favorable medium for bacterial growth.

Keywords: Bacterial growth; Fluorocarbons; Ocular bacterial contamination; *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus aureus*

REFERÊNCIAS

1. Chang S, Zimmerman NJ, Iwamoto T, Ortiz R, Faris D. Experimental vitreous replacement with perfluorotributylamine. *Am J Ophthalmol* 1987; 103:29-37.
2. Chang S. Low viscosity liquid fluorochemicals in vitreous surgery. *Am J Ophthalmol* 1987;103:38-43.
3. Chang S, Ozmert E, Zimmerman NJ. Intraoperative perfluorocarbon liquids in the management of proliferative vitreoretinopathy. *Am J Ophthalmol* 1988; 106:668-74.
4. Chang S, Reppucci V, Zimmerman NJ, Heinrmann MH, Coleman DJ. Perfluorocarbon liquids in the management of traumatic retinal detachments. *Ophthalmology* 1989;96:785-92.
5. Coll GE, Chang S, Sun J, Wieland MR, Berrocal MH. Perfluorocarbon liquid in the management of retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmology* 1995;102:630-9.
6. Bourke RD, Simpson RN, Cooling RJ, Sparrow JR. The stability of perfluoro-N-octane during vitreoretinal procedures. *Arch Ophthalmol* 1996;114: 537-44.
7. Moreira Jr CA, Moreira ATR, Moreira H. Perfluorocarbonos líquidos na cirurgia vitreo-retiniana: experiência de 5 anos. *Rev Bras Oftalmol* 1992;51: 311-4.
8. Moreira Jr CA, Moreira AT, Bonomo PP, Liggett P, Trousdale MD. Hialuronato de sódio como veículo para gentamicina intraocular: estudo "in vitro". *Rev Bras Oftalmol* 1990;49:13-20.
9. Brinton GS, Toppin TM, Hyndiuk RA, Aaberg TM, Reeser FH, Abrams GW. Posttraumatic endophthalmitis. *Arch Ophthalmol* 1984;102:547-50.
10. Forster RK. Etiology and diagnosis of bacterial postoperative endophthalmitis. *Ophthalmology* 1978;85:320-6.
11. Jaffe NS. Cataract surgery and its complications. 3rd ed. St. Louis: Mosby; 1981. p. 431-63.
12. Yasuda N, Suzanna Jr R, Yanaguita R. et al. Infecção intraocular experimental por *Staphylococcus epidermidis*. *Rev Bras Oftalmol* 1975;34:431-3.
13. Fernandes EG. Perfluorocarbono líquido: introdução de um novo conceito na cirurgia vitreo-retiniana. *Arq Inst Penido Burnier* 1994;36:8-11.
14. Moreira Jr CA. Uso de perfluorocarbonos líquidos na cirurgia vitreo-retiniana. In: Freitas JAH. Vitrectomia. Rio de Janeiro: RioMedi; 1994. cap.4.
15. Haidt SJ, Clark Jr LC, Ginsberg J. Liquid perfluorocarbon replacement of the eye [abstract]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1982;22:233.
16. Justa V. Evolução do instrumental para a cirurgia vítrea. In: Freitas JAH. Vitrectomia. Rio de Janeiro: RioMedi; 1994. cap.1.
17. Moreira Jr CA, Liggett P, Moreira H. Utilização de um novo perfluoroquímico líquido na cirurgia vitreo-retiniana: estudo experimental. *Arq Bras Oftalmol* 1992;55:63-9.
18. Moreira Jr CA; Liggett P, Moreira H. Utilização de um novo perfluoroquímico líquido na cirurgia vitreo-retiniana: estudo clínico. *Arq Bras Oftalmol* 1992;55:70-5.
19. Moreira Jr CA, Usocovich CE, Moreira AT. Experimental studies with perfluoro-octane for hemostasis during vitreoretinal surgery. *Retina* 1997;17: 530-4.
20. Myiamoto K, Refojo MJ, Tolentino FI, Fournier GA, Albert DM. Perfluoroether liquid as a long-term vitreous substitute: an experimental study. *Retina* 1984;4:264-8.
21. Queiroz Jr JM, Özler SA, Moreira Jr CA, Liggett PE. Histopathologic evaluation of subretinal perfluorocarbon liquids [abstract]. *Inv Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:881.
22. Queiroz Jr J, Özler SA, Liggett P, Moreira Jr CA, Alfaro DV. Experimental intraoperative use of perfluorotributylamine, perfluorodecaline, and perfluoropolyether. *Arq Bras Oftalmol* 1992;55:112-6.
23. Queiroz Jr JM. Estudo da toxicidade corneana de dois perfluorocarbonos líquidos. *Arq Bras Oftalmol* 1992;55:244-8.