



ARTIGO ORIGINAL

Indução de empiema em ratos através da inoculação pleural de bactérias

Experimental empyema in rats through intrapleural injection of bacteria

José Carlos Fraga¹, Sérgio L. Amantéa², Rodrigo Argenta³,
Leandro Moura³, Cláudio Nhuch³, Sandra Borowski⁴

Resumo

Objetivo: avaliar a indução experimental de empiema em ratos, através da inoculação intrapleural de duas bactérias (*Pasteurella multocida* e *Staphylococcus aureus*), utilizando técnica cirúrgica simples e de fácil execução.

Métodos: foram utilizados 24 ratos albinos da raça Wistar, de ambos os sexos, pesando entre 250 e 300g, que, após a anestesia geral, foram submetidos à toracotomia anterior direita, afastamento da musculatura e inoculação de 0,2ml de solução, conforme descrição a seguir: grupo I (n=12), inoculação de *Pasteurella multocida*, 10¹⁰ unidades formadoras de colônia/ml cultivados em caldo cérebro-coração; grupo II (n=8), inoculação de *Staphylococcus aureus*, 10¹⁰ unidades formadoras de colônia/ml cultivados em caldo cérebro-coração; e grupo III (n=4), inoculação de caldo cérebro-coração estéril (controle). Os animais foram sacrificados em até 7 dias, e a intensidade da reação pleural analisada macroscopicamente conforme escala padronizada. Também foram avaliados a mortalidade, o volume de líquido na cavidade pleural e o exame bacteriológico (animais mortos e líquido pleural).

Resultados: no grupo I (*Pasteurella multocida*), sete ratos morreram nas primeiras 48 horas de experimento. Cinco ratos foram sacrificados no período programado, mas nenhum deles apresentava empiema. No grupo II (*Staphylococcus aureus*), somente um animal morreu nas primeiras 24 horas, os outros 7 (88%) foram sacrificados e apresentavam empiema. No grupo III, considerados controles, todos os animais sobreviveram, não se observando nenhuma anormalidade torácica ao sacrifício. Analisando conjuntamente os grupos, a indução de empiema esteve associada de maneira significativa à inoculação de *Staphylococcus aureus* no espaço pleural (p<0,001). A quantidade de líquido obtida na cavidade pleural dos ratos deste grupo variou de 0,9ml a 3,9ml.

Conclusões: é possível induzir a formação de empiema em ratos, utilizando técnica cirúrgica simples, com a inoculação de *Staphylococcus aureus* no espaço intrapleural. A *Pasteurella multocida*, diferentemente do que ocorre em outros modelos animais, não foi capaz de induzir empiema nos ratos.

J Pediatr (Rio J) 2001; 77 (6): 469-74: doenças pleurais, Staphylococcus aureus, Pasteurella multocida.

Abstract

Objective: to evaluate empyema formation in rats through the injection of two bacteria (*Pasteurella multocida* and *Staphylococcus aureus*), using a simple, easy-to-use surgical technique.

Methods: twenty four anesthetized Wistar white rats, 250-300g in weight, submitted to right anterior thoracotomy, muscular retraction and injection of a 0.2ml solution into pleural space according the following scheme: Group I (n=12): injection of 10¹⁰ *Pasteurella multocida* cultured in brain heart infusion broth. Group II (n=8): injection of 10¹⁰ *Staphylococcus aureus* cultured in brain heart infusion broth. Group III (n=4): injection of bacterium-free brain heart infusion (control). The rats were sacrificed after seven days, and pleural reaction was assessed by macroscopy. Mortality, and intrathoracic liquid volume were evaluated, and bacteriological tests were also performed.

Results: Seven rats died within the first 48 hours in Group I (*Pasteurella multocida*); five completed the experiment, but none of them presented empyema. Only one animal died within the first 24 hours in Group II (*Staphylococcus aureus*); seven (88%) presented empyema at the time of sacrifice. All animals survived in Group III (control), without empyema or thoracic abnormalities. Pleural inoculation of *Staphylococcus aureus* (Group II) was significantly associated with empyema formation (P<0.001). In this group, the amount of pleural liquid ranged from 0.9 to 3.9ml.

Conclusion: It is possible to induce empyema in rats through *Staphylococcus aureus* pleural injection by a simple surgical technique. Differently from other experiments, the pleural injection of *Pasteurella multocida* did not provoke empyema in rats.

J Pediatr (Rio J) 2001; 77 (6): 469-74: pleural diseases, Staphylococcus aureus, Pasteurella multocida.

1. Professor Adjunto de Cirurgia Pediátrica, Depto. de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Mestre e Doutor em Medicina (UFRGS). Cirurgião Pediátrico do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
2. Professor Adjunto, Depto. de Pediatria da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFCMPA). Chefe do Serviço de Emergência Pediátrica do Hospital da Criança Santo Antônio de Porto Alegre, ISCMPA. Doutor em Pneumologia – UFRGS.
3. Monitores da Disciplina de Cirurgia, Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina da UFRGS.
4. Médica Veterinária do Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor (CPVDF), FEPAGRO.

Artigo submetido em 28.03.01, aceito em 27.06.01.

Introdução

Empiema, definido como o acúmulo de pus no espaço pleural, é responsável por elevada morbidade e mortalidade em crianças e adultos¹. O tratamento do empiema difere nos vários centros médicos, principalmente pela falta de ensaios clínicos adequadamente realizados em humanos, decorrente da dificuldade de se encontrar uma população homogênea de pacientes e da inexistência de um modelo experimental de fácil execução, e que possibilite testar as várias possibilidades terapêuticas disponíveis¹.

Alguns estudos experimentais conseguiram a indução de empiema em animais. Mavroudis e colaboradores² induziram empiema em porcos através da inoculação de vários agentes bacterianos (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Bacteroides fragilis*). Os animais foram divididos em três grupos individuais de 30 porcos, desenvolvendo-se empiema em 58% dos animais no grupo *Staphylococcus aureus*, 37% no grupo *Escherichia coli*, e não obteve êxito em nenhum animal do grupo *Bacteroides fragilis*. Seu objetivo principal não estava centrado na análise exclusiva do empiema, mas na avaliação do seu comportamento na presença de hemotórax².

Sasse e colaboradores³ induziram empiema em coelhos através da inoculação pleural por toracocentese de *Pasteurella multocida* cultivada em agar. Apesar do referido modelo ser o que melhor mimetizou empiema observado em seres humanos³⁻⁶, ele apresenta algumas dificuldades para ser empregado como modelo animal em nosso meio. Tonietto e colaboradores⁷ publicaram estudo recente sobre a indução de empiema em ratos, através da inoculação intrapleural de 1ml/kg de solução contendo *Staphylococcus aureus* (10^{10} células/ml) diluída em caldo cérebro-coração (BHI). A bactéria foi isolada e cultivada a partir da mucosa oral do rato e inoculada após toracotomia com o animal anestesiado, sob intubação traqueal. Apesar desse estudo ter sido realizado em ratos, animais ideais para experimentação em nosso meio devido ao baixo custo, facilidade de manuseio e de manutenção, a técnica empregada foi muito sofisticada, com a necessidade de intubação traqueal e anestesia inalatória do animal durante o procedimento cirúrgico.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a indução experimental de empiema em ratos, através da inoculação intrapleural de duas bactérias (*Pasteurella multocida* e *Staphylococcus aureus*), utilizando técnica cirúrgica simples e de fácil execução.

Métodos

Estudo experimental controlado, realizado no Centro de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (CPVDF), em biotério isolado e específico para trabalho contaminado. Foram selecionados vinte e quatro ratos albinos da raça Wistar, adultos, de ambos os sexos, pesando entre 250 e 300g, obtidos aleatoriamente do mesmo criador. De acordo

com a colônia de bactérias a ser utilizada para inoculação, os animais foram divididos em três grupos principais:

- *grupo I (n=12)*: inoculação no espaço pleural de 0,2ml de solução de *Pasteurella multocida*, 10^{10} unidades formadoras de colônias (UFC)/ml, diluída em caldo de cérebro-coração (BHI). Desconhecendo o comportamento do animal frente à exposição bacteriana, especialmente a perda precoce por infecção, os animais foram subdivididos em dois subgrupos, de acordo com a utilização de antibioticoterapia, iniciada a partir da recuperação pós-operatória;
- *subgrupo Ia (n=8)*: solução de amoxicilina em concentrações de 0,05 ou 0,1%, diluída na ração hídrica diária, administrada por via oral *ad libitum*;
- *subgrupo Ib (n=4)*: ausência de antibiótico na ração hídrica diária, administrada por via oral *ad libitum*.
- *grupo II (n=8)*: inoculação no espaço pleural de 0,2ml de solução de *Staphylococcus aureus*, 10^{10} UFC/ml, diluída em BHI;
- *grupo III (n=4)*: inoculação no espaço pleural de 0,2ml de caldo de cérebro-coração (BHI) estéril.

A bactéria *Pasteurella multocida* foi obtida no laboratório do CPVDF. A bactéria *Staphylococcus aureus* foi isolada da mucosa oral dos animais, coletada através de *swab* e cultivada no laboratório do CPVDF.

A logística do experimento esteve fundamentada em duas etapas de avaliação. Num primeiro momento, os autores testaram o modelo experimental de indução do empiema nos ratos fazendo uso apenas da inoculação de *Pasteurella multocida* (n=12) e dos respectivos controles (n=2). Numa segunda etapa, sucedeu-se o experimento com a inoculação do *Staphylococcus aureus* (n=8) e seus respectivos controles (n=2).

O projeto foi avaliado e aprovado pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e pelo Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor (CPVDF). Durante todo o estudo, os animais foram tratados de acordo com protocolo específico para manejo e cuidado com animais de laboratório.

Indução do empiema

A indução anestésica dos animais foi realizada por via inalatória, através de algodão embebido em éter etílico, em câmara de vidro fechada. A manutenção anestésica foi feita com pentobarbital sódico (25mg/kg) administrado por via intraperitoneal. Os ratos eram posicionados em decúbito dorsal, realizada tricotomia na região torácica anterior, antisepsia com iodofor alcoólico e colocação de campos esterilizados. Realizada toracotomia anterior oblíqua no hemitórax direito, com afastamento da musculatura e exposição dos espaços intercostais. Realizada abertura do 4º espaço intercostal com pinça hemostática e inoculação da solução. Concluída esta etapa do experimento, a muscula-

tura previamente afastada era liberada, com posterior fechamento da pele com fio mononylon 4-0. Todo o procedimento foi realizado de maneira asséptica.

Verificação do empiema

Todos os animais eram sacrificados com a administração de dose letal de pentobarbital sódico por via intraperitoneal. Os animais que morriam antes do término do experimento eram necropsiados, avaliando-se a presença de empiema, e coletadas amostras teciduais de fígado e baço para cultura.

A caracterização de empiema se dava pela presença de líquido pleural de aspecto turvo e identificação de microrganismo à avaliação bacteriológica do material.

Análise macroscópica das alterações pleurais

Os animais foram sacrificados três, cinco ou sete dias após a inoculação pleural.

Os animais do grupo I foram sacrificados em 7 dias. Metade dos animais do grupo II foi sacrificada em três dias e a outra metade, em 5 dias. No grupo controle (grupo III), metade dos animais foi sacrificada em cinco dias e a outra metade, em sete dias.

Após o sacrifício, as anormalidades pleurais foram analisadas macroscopicamente conforme escala de intensidade da reação pleural (Tabela 1).

Tabela 1 - Graduação macroscópica da reação pleural*

Grau	Achado macroscópico
0	Ausência de aderência ou líquido pleural
1	Líquido turvo, com aderência no local da incisão cirúrgica
2	Líquido purulento, com fibrina, com moderada aderência pleural
3	Aderências densas e bem desenvolvidas, com ou sem líquido pleural
4	Empiema franco, encapsulado, com fibrose

* Adaptado de Tonietto et al.⁷

Análise estatística

As variáveis de caracterização da amostra são descritas em valores absolutos e percentuais, com respectivas médias e desvios-padrão. As diferenças no volume médio de líquido obtido são comparadas através do *Teste t* para amostras não pareadas. A associação entre as bactérias inoculadas e a indução de empiema é testada pelo *Teste do Qui-quadrado*. Um valor de "p" de 0,05 foi considerado como de significância.

Resultados

A distribuição dos animais nos três grupos, quanto à sua sobrevivência após a inoculação bacteriana intrapleural e o término do experimento (por sacrifício dos animais), pode ser observada na Figura 1.

No grupo I (n=12), sete ratos morreram nas primeiras 48 horas de experimento. Cinco ratos foram sacrificados no período estipulado de uma semana, mas em nenhum deles foi evidenciado achados compatíveis com empiema. Um deles exibia fibrose de parede torácica, enquanto os outros quatro não apresentavam nenhuma anormalidade à avaliação macroscópica da parede torácica. Analisando individualmente os subgrupos do experimento, observa-se que o uso de antibiótico no *subgrupo Ia* não diminuiu a mortalidade dos animais, nem tampouco contribuiu para a indução do empiema (Figura 2).

No grupo II (n=8), somente um animal morreu nas primeiras 24 horas após a inoculação do agente bacteriano (*Staphylococcus aureus*). Todos os outros (n=7, 88%) completaram a experimentação e apresentavam evidências de empiema à macroscopia. O período em que foi realizado o sacrifício não evidenciou diferenças quanto aos achados, embora a quantidade média de líquido resgatado tenha tendido a ser maior nos animais analisados três dias após a inoculação bacteriana ($3,5 \pm 0,1\text{ml} \times 2,0 \pm 2,8\text{ml}$ com medianas de 3,5 e 1,1 respectivamente). Tal diferença não foi significativa ($p=0,09$), e a quantidade total de líquido obtido variou de 0,9ml a 3,9ml. A cultura desse líquido apresentou crescimento de *Staphylococcus aureus*.

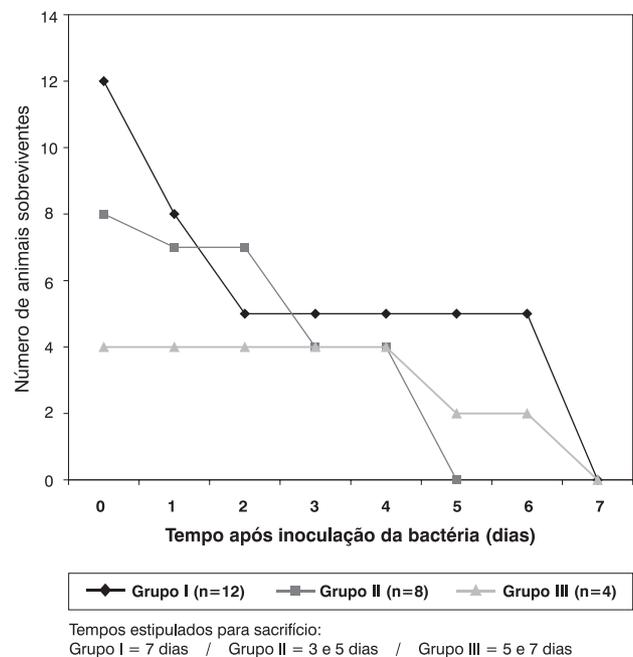


Figura 1 - Sobrevida e sacrifício dos ratos após a inoculação (Tempo 0) de bactéria intrapleural

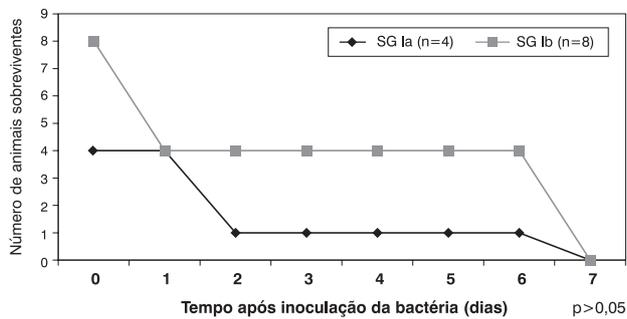


Figura 2 - Sobrevida e sacrifício dos ratos após inoculação (Tempo 0) de *Pasteurella multocida* (Grupo I), considerando uso ou não de antibioticoterapia

No grupo III (n=8), considerados controles, todos os animais sobreviveram, não se observando líquido pleural ou anormalidade torácica no sacrifício.

A cultura de tecido (baço e fígado) dos animais mortos antes do sacrifício mostrou a mesma bactéria previamente inoculada no espaço intrapleural. Na Tabela 2, podemos observar a distribuição dos achados macroscópicos da reação pleural conforme escore de intensidade.

Analisando estatisticamente os resultados obtidos entre os grupos, podemos observar associação estatisticamente significativa de ocorrência de empiema em animais inoculados com *Staphylococcus aureus* ($p < 0,001$).

Tabela 2 - Achados macroscópicos no momento do óbito ou no sacrifício dos animais (de acordo com graduação da Tabela 1)

		Graduação achados macroscópicos				
		0	1	2	3	4
Grupo I	(n=12)	12	–	–	–	–
Grupo II	(n=8)	1	7	–	–	–
Grupo III	(n=4)	–	–	–	–	–

$p < 0,001$

Discussão

O tratamento apropriado do empiema é controverso e tem sido baseado na experiência pessoal e no limitado número de casos relatados na literatura. As decisões cirúrgicas são influenciadas por uma série de variáveis, tais como idade do paciente, estado clínico, resposta à antibioticoterapia, microorganismos nos culturais, estágio e dura-

ção do empiema. Os tratamentos possíveis incluem somente antibióticos, ou antibióticos associados a toracocentese, drenagem torácica fechada, fibrinolíticos, toracoscopia, minitoracotomia, drenagem torácica aberta, toracotomia usual e decorticação^{1,8,9}. A criação de modelos experimentais de empiema é fundamental para estudar prospectivamente estas várias opções terapêuticas disponíveis, podendo-se realizar estudos em fases específicas do empiema, além de poder controlar variáveis clínicas de confusão e estabelecer um número adequado de animais, objetivando conferir maior poder estatístico às análises.

Light tem sido o pesquisador que mais tem estudado empiema experimentalmente^{1,3,8}. Ele desenvolveu um modelo de empiema em coelhos, através da instilação intrapleural de *Pasteurella multocida*. A inoculação intrapleural é realizada através de punção torácica^{3,6,8}. Devido a extrema vulnerabilidade desses animais, com morte precoce por sepse, esse autor administra antibiótico parenteral (penicilina) diariamente. O grande inconveniente para utilização desse modelo em nosso meio é operacional. O custo do animal é elevado, além de necessitar cuidados específicos para a sua manutenção que, freqüentemente, requerem a utilização de um laboratório mais sofisticado para manter esses animais livres de doenças. Esse modelo tem sido reproduzido em outros centros, com sucesso, com a realização de investigações específicas sobre o manejo do empiema⁶. Embora utilize um procedimento minimamente invasivo, de fácil execução técnica (punção e inoculação da bactéria), é realizado através da monitorização da pressão intrapleural (transdutor conectado a osciloscópio), visando facilitar a confirmação do espaço pleural^{3,6}.

Ao idealizarmos este estudo, acreditávamos que o ideal para nossa realidade seria o desenvolvimento de modelo experimental em ratos, pois esses animais são baratos, resistentes e de fácil manutenção em nosso meio.

Recentemente, Tonietto e colaboradores⁷ relataram estudo de empiema em ratos, através de instilação intrapleural de *Staphylococcus aureus*. A bactéria foi isolada da saliva do animal e cultivada em laboratório. O animal foi submetido à anestesia geral, intubação traqueal e toracotomia para exposição da região pleural. Apesar de ter sido utilizado um animal considerado mais apropriado à nossa realidade, a técnica de anestesia e cirurgia realizadas, com necessidade de intubação traqueal e ventilação mecânica, tornam o modelo ainda sofisticado e, conseqüentemente, de difícil reprodução.

O experimento por nós idealizado é de técnica mais simples. Faz uso de ratos como modelo animal, mas utiliza técnica anestésica sem necessidade de intubação traqueal ou uso de suporte ventilatório mecânico. A abordagem cirúrgica através de toracotomia foi semelhante ao estudo relatado previamente⁷, porém sem necessidade do animal ser submetido à técnica de traqueostomia para obtenção da via aérea, nem necessitar de ventilação artificial mecânica. No nosso experimento, o procedimento técnico realizado

foi simples e seguro. Mesmo o pequeno pneumotórax residual que eventualmente ocorreu após a toracotomia não provocou mortalidade, já que todos os animais utilizados como controles sobreviveram ao procedimento cirúrgico (grupo III). Isso é importante relatar, pois, após o término do procedimento cirúrgico, os pesquisadores não tiveram nenhuma preocupação de aproximação da musculatura torácica ou remoção do ar residual antes do fechamento da pele, diferentemente dos modelos experimentais anteriores⁶.

Iniciamos nosso estudo com a *Pasteurella multocida*, por ela ser inofensiva ao homem^{3,8} e ser a bactéria mais utilizada na indução do empiema em outros modelos animais. Entretanto, não tínhamos nenhuma informação acerca da infectividade dessa bactéria no rato. A mortalidade expressiva antes de 48 horas, com cultura de fígado e baço desses animais mostrando a presença da bactéria, supõe que os animais morreram devido à sepse causada pelas bactérias inoculadas. A mortalidade observada foi expressiva logo após a inoculação dessa bactéria, independente da administração de antibiótico. A preocupação com a composição de um subgrupo que fizesse uso diário de antibiótico por via oral também nos trouxe algumas dificuldades. Apesar de sabermos da absorção errática da droga administrada por essa via, a prescrição diária de antibiótico parenteral, como proposto por Sasse et al.³, necessitaria anestesia diária do animal, tornando o experimento complexo e fugindo dos objetivos de criar um modelo de fácil execução. Portanto, optamos pela utilização do antibiótico por via oral. Mesmo utilizando doses elevadas de antibiótico, não conseguimos obter empiema após a inoculação pleural da *Pasteurella multocida*, já que os animais continuaram morrendo precocemente por septicemia. Talvez a rota utilizada para administração da droga não tenha sido ideal, sob o ponto de vista absorptivo, e que os animais tenham morrido por não atingirem níveis terapêuticos do fármaco, mas o fato é que mesmo os animais que sobreviveram não desenvolveram empiema.

Na segunda etapa de nosso experimento, com a inoculação de *Staphylococcus aureus*, observou-se a presença de líquido pleural turvo nos animais sacrificados, tanto após 3 dias, quanto após 5 dias da inoculação. A cultura desse líquido confirmou a presença de *Staphylococcus aureus*, caracterizando a presença do empiema.

Em se tratando de um estudo experimental, algumas considerações metodológicas merecem ser discutidas. Uma potencial limitação do estudo pode estar direcionada para a possibilidade de comparação dos achados entre os dois primeiros grupos, principalmente ao considerarmos que a análise dos achados macroscópicos foi realizada em momentos distintos de sacrifício dos animais. Mesmo cientes dessa potencial limitação, é importante ressaltar que não fomos capazes de demonstrar achados compatíveis com empiema em nenhum dos animais analisados no grupo I. Este achado, mais do que qualquer comparação, já nos é suficiente para considerar que a inoculação de *Pasteurella*

multocida no espaço pleural de ratos não é adequada para a viabilização de um modelo experimental de empiema, pelo menos dentro das técnicas por nós utilizadas. Nosso principal objetivo era viabilizar um novo modelo experimental para doença respiratória tão prevalente, o que conseguimos obter com utilização das colônias de *Staphylococcus aureus*, utilizando uma técnica mais simples do que aquelas usadas anteriormente⁷.

A opção de sacrificarmos os animais em tempos menores no grupo II (*Staphylococcus aureus*) estava embasada na possibilidade de identificarmos manifestações pleurais mais sutis, que de alguma maneira pudessem ocorrer mais precocemente nesse modelo animal, considerando os resultados obtidos na primeira fase do experimento. Acreditamos que isso definitivamente não ocorreu, já que os achados macroscópicos evidenciados, a aparência e o volume do líquido obtido vêm sugerir uma resposta inflamatória pleural significativa, tanto aos três quanto aos cinco dias.

A técnica cirúrgica da toracotomia e o meio de diluição das bactérias antes de sua inoculação na região pleural não ocasionaram nenhuma complicação nos animais estudados. Isso pôde ser comprovado nos animais utilizados como controle (grupo III), que sobreviveram até o final do experimento e não apresentaram nenhuma anormalidade macroscópica no momento da necropsia. De alguma maneira, isso também diminui a influência que poderíamos ter tido nos resultados, pela não randomização do experimento, isto é, uma maior mortalidade dos animais e/ou insucesso no grupo primeiramente experimentado.

Este estudo mostrou que é possível a realização de toracotomia e inoculação pleural de bactéria em ratos anestesiados, utilizando técnica cirúrgica simples, sem necessidade de intubação traqueal e/ou ventilação mecânica. Para aplicabilidade desse modelo, a não utilização de suporte ventilatório mecânico garante sua viabilidade operacional, mesmo em centros de pesquisa animal com menores recursos tecnológicos. Da mesma maneira, a não realização do procedimento cirúrgico complementar para obtenção de um acesso à via aérea por traqueostomia diminui a complexidade da intervenção do pesquisador e do tempo despendido com o procedimento, com um resultante potencial aumento de morbidade. Neste modelo animal, a inoculação intrapleural de *Pasteurella multocida*, em concentrações de 10^{10} UFC/ml, mostrou extrema virulência, levando à morte precoce a maioria dos animais. Mesmo naqueles que sobreviveram, não foi possível observar a indução de empiema, o que faz de tal experimentação um modelo inadequado para o objetivo estabelecido. Entretanto, no mesmo modelo animal, a inoculação intrapleural de *Staphylococcus aureus*, em concentrações de 10^{10} UFC/ml, provoca a formação de empiema, tanto em 3 quanto em 5 dias após o procedimento cirúrgico. Tais achados abrem novas perspectivas para o desenvolvimento de estudos experimentais direcionados para uma melhor avaliação e manejo do empiema.

Referências bibliográficas

1. Light RW. *Pleural Diseases*. 3ª ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1995.
2. Mavroudis C, Ganzel BL, Katzmark S, Polk HC. Effect of hemothorax on experimental empyema thoracic in the guinea pig. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1895; 89:42-9.
3. Sasse SA, Causing LA, Mulligan ME, Light RW. Serial pleural fluid analysis in a New Experimental Model of Empyema. *Chest* 1996; 109:1043-8.
4. Mackinlay TAA, Lyons GA, Chimondeguy DJ, Piedras MAB, Angaramo G, Emery J. VATS debridement versus thoracotomy in the treatment of loculated postpneumonia empyema. *An Thorac Surg* 1996; 61: 1626-30.
5. Temes RT, Follis F, Kessler RM, Pett SB, Wernly JA. Intrapleural fibrinolytics in the management of empyema thoracis. *Chest* 1996; 110:102-6.
6. Teixeira LR, Sasse AS, Villarino MA, Nguyen T, Mulligan ME, Light RW. Antibiotic levels in empyema pleural fluid. *Chest* 2000; 117: 1734-9.
7. Tonietto T, Pilla ES, Madke GR, Silva UL, Felicetti JC, Camargo JJP, et al. Empiema pleural experimental em ratos: avaliação dos efeitos do uso intrapleural de Dextran-40 na fase fibrinopurulenta. *J Pneumol* 1999; 25:147-52.
8. Sasse S, Nguyen TK, Mulligan M, Wang NS, Mahutte CK, Light RW. The effects of early chest tube placement on empyema resolution. *Chest* 1997; 111:1679-83.
9. Fraga JC, Nunes G, Hinke T, Schopf L, Antunes CR. Toracosopia em crianças com derrame parapneumônico complicado. *Revista HCPA* 2000; 20:13-20.

Endereço para correspondência:

Dr. José Carlos Fraga
Rua Ramiro Barcelos, 2350 – sala 600
CEP 90430-000 – Porto Alegre, RS
Fone: 51 3316.8232
E-mail: jcfraga@conex.com.br