

PERITONITE INFECCIOSA COM QUANTITATIVOS E QUALITATIVOS BACTERIANOS CONHECIDOS – ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS

INFECTIOUS PERITONITIS WITH KNOWN BACTERIAL CONCENTRATION – EXPERIMENTAL STUDY IN RATS

Gilton Ângelo Guilgen, TCBC-PR¹
Nicolau Gregori Czesko, TCBC-PR²
Osvaldo Malafaia, TCBC-PR³
João Carlos Simões, TCBC-PR⁴

RESUMO: O objetivo deste estudo é o desenvolvimento de peritonite difusa com qualitativos e quantitativos bacterianos conhecidos. Foram analisados 150 ratos, adultos, machos, da raça Wistar, com peso médio de 150 gramas. Inocularam-se, percutaneamente, na cavidade peritoneal, suspensões constituídas de *Escherichia coli* e *Bacteroides fragilis* em concentrações conhecidas, na proporção de 1ml para cada 100 gramas de peso. Os animais foram distribuídos em cinco grupos de trinta ratos. No grupo I (grupo-controle) inoculou-se solução de cloreto de sódio a 0,9%. Nos demais grupos a concentração do inóculo foi a seguinte: grupo II, com suspensão a 10 (9); grupo III, com suspensão a 10 (8); grupo IV, suspensão a 10 (7) e grupo V com suspensão a 10 (6). Sempre que se detectou o óbito, o animal era submetido à necropsia para avaliação da cavidade peritoneal e colheita de secreções para cultura. Os ratos sobreviventes foram aleatoriamente alocados em dois subgrupos. Os animais do subgrupo A foram sacrificados 24 horas após a inoculação e os do subgrupo B, 120 horas após a inoculação. Observou-se que os ratos do grupo I (controle) evoluíram sem o desenvolvimento de peritonite. Nos grupos II e III, 100% dos ratos do subgrupo A e 95,83% dos ratos do subgrupo B desenvolveram peritonite aguda e óbito em menos de 24 horas. No grupo IV, somente 4,17% desenvolveram peritonite e foram a óbito em 72 horas, e no grupo V não ocorreu a formação de peritonite e não houve óbito. Os animais que foram a óbito dos grupos II e III, 96,67% mostraram alterações macroscópicas com exsudato peritoneal difuso, aderências peritoneais mas sem abscesso. Todos os animais com peritonite, desenvolveram derrame pleural bilateral. Nos animais que foram a óbito, nos grupos II e III, evidenciou-se a presença de *Escherichia coli* e *Bacteroides fragilis* como causadores das alterações peritoneais e pleurais. Este modelo mostrou que os animais que receberam altas concentrações bacterianas mostraram maior perda de peso, alterações clínicas de sepsis, peritonite difusa aguda, derrame pleural e óbito precoce.

Unitermos: Peritonite; Punção da cavidade peritoneal; Inoculação bacteriana.

INTRODUÇÃO

Entende-se por peritonite a inflamação de um segmento ou de toda a superfície parietal e visceral da membrana peri-

toneal. Classicamente as peritonites são divididas em peritonite primária e secundária. A peritonite secundária é subdividida em peritonite supurativa aguda, química e granulomatosa.¹ A literatura consigna vários modelos experimentais

1. Professor Assistente de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná. Mestre em Cirurgia pela Universidade Federal do Paraná. Diretor Administrativo do Pronto Socorro do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba.
2. Professor Adjunto de Cirurgia da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná. Mestre e Doutor pela Universidade Federal do Paraná. Diretor Médico do Pronto Socorro do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba.
3. Professor Adjunto de Cirurgia da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná. Professor Titular de Cirurgia do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.
4. Professor Titular de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná. Mestre e Doutor em Cirurgia pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Chefe do Serviço de Oncologia do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba.

Recebido em 1/7/96

Aceito para publicação em 28/7/97

Trabalho realizado no laboratório da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná. Resumo de Tese de Mestrado apresentada à Universidade Federal do Paraná.

utilizados na indução de peritonite difusa aguda: inoculação de material fecal;^{2,3,4} cerclagem e punção do ceco;⁵ implantação intraperitoneal de cápsula gelatinosa contendo suspensão bacteriana.^{6,7,8,9} Tem sido relatada a desvantagem de se trabalhar com peritonite experimental induzida por fezes dos próprios animais ou humana em razão da resistência à sua própria flora fecal e por não se conhecer a concentração polimicrobiana utilizada.¹⁰

Nichols et al, 1978, desenvolveram estudos com fezes humanas em cápsulas de gelatina que foram introduzidas cirurgicamente na cavidade peritoneal de ratos, concluindo ser um modelo econômico, porém de difícil padronização.¹⁰

Poucos são os trabalhos existentes que usam suspensões bacterianas isoladas ou associadas para produzir peritonite e que teriam as vantagens de utilizar inóculos previamente conhecidos e quantificados e, portanto, passíveis de serem reproduzidos com fidedignidade, de fácil execução, sem necessidade de laparotomia prévia e pouco dispendiosos.

O objetivo deste trabalho foi o de produzir um modelo experimental de peritonite aguda, em ratos, com qualitativos e quantitativos bacterianos conhecidos, verificar a validade do modelo, mostrar as alterações clínicas dos animais, as modificações macroscópicas da cavidade peritoneal e pleural; fazer os estudos bacteriológicos e determinar o tempo de sobrevivência dos animais relacionado com as várias concentrações dos inóculos bacterianos.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se 150 ratos, machos, da raça Wistar, com peso variando entre 120 e 180 gramas, distribuídos em cinco grupos de trinta, sendo o grupo I definido como grupo controle e os grupos II a V como grupo de experimentação. Os ratos do grupo I foram inoculados com solução de cloreto de sódio a 0,9% e os outros grupos (II a V) com suspensão bacteriana de *Escherichia coli* e *Bacteroides fragilis* em diferentes concentrações (Tabela 1)

As suspensões de *Escherichia coli* (ATCC 25922) foram cultivadas em placas de ágar-sangue e incubadas aerobicamente a 37°C por 18 horas. As suspensões de *Bacteroides fragilis* (ATCC 23745) foram cultivadas em placas de ágar-sangue suplementadas para anaeróbios e incubadas anaerobicamente a 37°C por 48 horas. Após a incubação, as cepas foram subcultivadas em *peptone yeasth broth* e incubadas novamente nas atmosferas indicadas por 18 horas. As concentrações bacterianas eram medidas em meios apropriados para contagem de colônias (Agar Plate Count). Foi respeitado o tempo de uma hora, utilizado nos animais de cada grupo.

A inoculação foi realizada com punção percutânea intraperitoneal, com seringas de 5ml e agulhas de 25x7, após anestesia inalatória e anti-sepsia do quadrante inferior esquerdo com álcool a 70%. A quantidade injetada era de 1ml de cada suspensão para cada 100 gramas de peso dos ratos. O controle dos animais era diário, com pesagem, observação

Tabela 1

Relação entre os grupos de animais, número de animais e concentração do inóculo bacteriano

Grupo	Número de animais	Concentração do inóculo
I	30	cloreto de sódio 0,9%
II	30	suspensão a 10(9)A e B
III	30	suspensão a 10(8)C e D
IV	30	suspensão a 10(7)E e F
V	30	suspensão a 10(6)G e H

das alterações clínicas características de septicemia evolutiva: diminuição da atividade física, redução da ingestão de água e ração, piloereção, taquipnéia e formação de halo de coloração escurecida em torno dos olhos.

Sempre que se detectou o óbito do animal, este era submetido a necropsia, e os animais sobreviventes foram distribuídos aleatoriamente em dois subgrupos: subgrupo A, que foram sacrificados após 24 horas da inoculação (seis animais); subgrupo B, que foram sacrificados após 120 horas da inoculação (24 animais)

Após o sacrifício procedia-se à observação macroscópica do conteúdo da cavidade peritoneal e pleural e era realizado o exame das vísceras.

A colheita de secreção peritoneal e pleural foi realizada por aspiração com seringa esterilizada e colocada em meio de transporte de Amies e encaminhada para cultura aeróbica e anaeróbica. Quando não havia líquido livre nas cavidades, a colheita era realizada com swab.

O meio seletivo utilizado para cultivo da *E. coli* foi MacConkey Agar e para *B. Fragilis* utilizou-se o meio de Bacteróides-bile-esculina ágar.

Utilizou-se o método de estatística inferencial, teste t de Student e, não sendo este possível, utilizaram-se os métodos de estatística descritivos. Definiu-se como nível de significância estatística $p < 0,05$.

RESULTADOS

No grupo I (controle) observou-se que os ratos do subgrupo A (6 animais) tiveram um ganho médio de peso de 10g, e os animais do subgrupo B (24 ratos), um ganho médio de peso de 22g. No grupo II e III, todos os animais do subgrupo A foram a óbito, não sendo possível a avaliação ponderal; no subgrupo B, um rato teve ganho ponderal de 20g e 5g respectivamente. No grupo IV, os ratos do subgrupo A tiveram uma perda média de peso de 5g, e os do subgrupo B tiveram um ganho médio de peso de 15g. No grupo V, os animais do subgrupo A tiveram um ganho médio de 5g, e os animais do subgrupo B, um ganho médio de 23g (Tabela 2).

Nos animais do grupo controle não se observaram alterações clínicas, o mesmo ocorrendo com os animais do grupo IV e V. Nos grupos experimentais II e III, as alterações clínicas observadas no controle do animal foram: diminuição da atividade física, redução da ingestão de água e ração, piloereção, taquipnéia e formação de halo escuro ao redor dos olhos.

No grupo controle não ocorreu óbito. Nos animais dos outros grupos, a frequência e o percentual de mortalidade foram variados e podem ser observados na tabela 3.

Tabela 2

Relação entre os grupos e subgrupos de animais, o número de animais e a variação ponderal média, entre o dia da inoculação e o do sacrifício.

Grupo	Subgrupo	Nº de animais	Varição ponderal Média+/- DP
I	A	6	10 +/- 4
	B	24	22 +/- 7
II	A	0	(-)
	B	1	20 +/- 0
III	A	0	(-)
	B	1	5 +/- 0
IV	A	6	5 +/- 7
	B	23	15 +/- 9
V	A	6	5 +/- 3
	B	24	23 +/- 7

D.P. = desvio padrão
(-) = não realizado

Tabela 3

Relação entre os grupos e subgrupos de animais, número de animais, frequência e percentual de mortalidade.

Grupo	Subgrupo	Nº de animais	Mortalidade	
			Frequência	Porcentual
I	A	6	0	-
	B	24	0	-
II	A	6	6	100%
	B	24	23	95,83%
III	A	6	6	100%
	B	24	23	95,83%
IV	A	6	0	-
	B	24	1	4,17%
V	A	6	0	-
	B	24	0	-

(-) : não realizado

No grupo I não se observou alteração na cavidade peritoneal e pleural. Nos animais que foram a óbito constatou-se peritonite difusa e aderências peritoneais sem abscesso, fato que ocorreu no grupo II, III e IV (Figura 1). No animal sobrevivente do grupo II e III do subgrupo B, o aspecto macroscópico era normal, o mesmo ocorrendo com todos os animais que sobreviveram no grupo IV. Nos animais do grupo V não se observaram alterações peritoneais ou pleurais. Nos ratos que foram a óbito nos grupos II, III e IV constatou-se derrame pleural (Tabela 4).

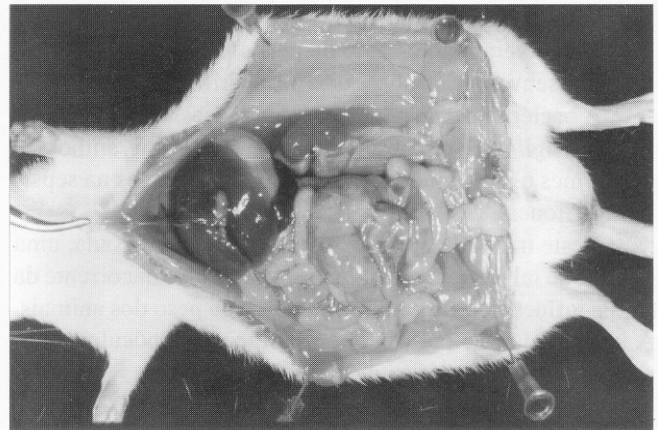


Figura 1—Aspecto macroscópico de rato do grupo II com peritonite difusa aguda

Tabela 4

Relação entre os animais que foram a óbito, presença de peritonite difusa, abscesso intraperitoneal, aderências peritoneais e derrame pleural.

Grupo	N	Peritonite	Abscesso	Aderência	Derrame pleural
I	0	não	não	não	não
II	29	sim	não	sim	sim
III	29	sim	não	sim	sim
IV	1	sim	não	sim	sim
V	0	não	não	não	não

No grupo I não se evidenciou germe nas culturas. Nos demais sobreviventes a distribuição ocorreu de forma variada, conforme tabela 5.

Tabela 5

Relação entre os grupos de animais, o número e porcentagem que foram a óbito, o tipo de colheita e a bactéria encontrada na cultura

Grupo animal	Nº de animais	Nº de Óbitos		Tipo de Colheita		Abdome		Tórax	
		Freq	(%)	SWAB	Aspiração	E.c.	B.f.	E.c.	B.f.
I	30	0	-	-	-	-	-	-	-
II	30	29	(96,67)	não	sim	P	P	P	P
III	30	29	(96,67)	não	sim	P	P	P	P
IV	30	1	(3,33)	não	sim	P	E	P	E
V	30	0	-	-	-	-	-	-	-

DISCUSSÃO

Neste modelo de produção de peritonite experimental optou-se pelo rato de raça Wistar, sendo possível induzi-la com facilidade e comparar grandes grupos de animais. O custo de obtenção, controle e manutenção desses animais é baixo e fácil quando comparado com animais de grande porte.

A escolha das cepas de *E. Coli* deve-se ao fato de ser este germe responsável pela etiologia da maior parte das peritonites bacterianas de alta mortalidade. Estudos realizados

por Onderdonk et al e Bartlett et al^{11,4} mostraram que animais que sobreviveram ao estágio de peritonite aguda posteriormente desenvolveram abscessos intraperitoneais.

A bactéria responsável por estes abscessos era o *Bacteroides fragilis*. Estas observações sugerem que ambos os coliformes e anaeróbios são importante patógenos na sepsis intraperitoneal.

Neste trabalho, a variação ponderal foi analisada, uma vez que se julgou que o estado hipercatabólico decorrente da sepsis influenciou no ganho e/ou perda de peso dos animais. A indução de peritonite e a concentração do inóculo bacteriano revelaram significativa variação ponderal.

A observação clínica após a indução da peritonite mostrou alterações como: diminuição da atividade física, piloereção, redução da ingestão de água e ração e halo escuro em torno dos olhos.

A taxa de mortalidade foi diretamente proporcional à concentração de bactérias inoculadas. As suspensões de 10 (9) e 10 (8) de *Escherichia coli* e *Bacteroides fragilis* causam uma letalidade aguda. E as suspensões de 10 (7) e 10 (6) determinam leve mortalidade com resultados semelhantes ao grupo controle.

Nos animais dos grupos II, III e IV que foram a óbito, observou-se macroscopicamente a ocorrência de peritonite aguda difusa, com mau cheiro, aderências peritoneais e sem a formação de abscessos intraperitoneais, uma vez que provavelmente não houve tempo para a formação deles. Segundo os resultados definidos pelas tabelas apresentadas há uma nítida associação entre a presença da peritonite aguda e efusão pleural. Entendeu-se a presença do derrame pleural na vigência da peritonite como mais um indicador da gravidade do processo infeccioso intraperitoneal e que deve alcançar a cavidade pleural através dos linfáticos diafragmáticos.^{12,13}

Nos animais que foram a óbito dos grupos II e III evidenciou-se a presença de *Escherichia coli* e *Bacteroides fragilis* como responsáveis pelas alterações peritoneais, pleurais e mortalidade dos ratos.

Pelos dados obtidos é possível concluir que o método de inoculação da suspensão bacteriana por punção percutânea da cavidade peritoneal de ratos demonstrou ser um modelo experimental prático, seguro, de baixo custo e fácil execução, prescindindo de laparotomia prévia, e possibilita uma padronização com o uso de inóculo bacteriano qualitativamente e quantitativamente conhecido.

ABSTRACT

This study reveals development of diffuse peritonitis model in rats with a known bacterial concentration. We analysed 150 rats, adults, male, Wistar race with medium weight of 150 grams. Solutions of Escherichia coli and Bacteroides fragilis in different concentrations were percutaneous inoculated into the peritoneal cavity in the following proportion: 1 ml of each suspension to each 100 grams of the total weight of the rat. The animals were allocated in five groups of thirty rats. On group I (control) a solution of sodium chloride 0.9%. On the following groups the proportions were as follows: group II – 10(9); group III – 10(8); group IV – 10(7) and group V – 10(6). After a rat death, a necropsy was performed in order to evaluate macroscopic effects on peritoneal cavity as well collect samples of secretions for culture. The survival rats of each group were subdivided with no choice in two subgroups. The animals for subgroup A were sacrificed 24 hours after inoculation and the ones of subgroup B, 120 hours after inoculation. We observed that the rats of group I did not acquire peritonitis. On group II and III, 100% of subgroup A and 95.03% of subgroup B, developed acute peritonitis. On group IV, only 4.17% developed peritonitis and died 72 hours and on group V neither peritonitis or death developed. The animals which died on group II and III on an average of 96.67% showed macroscopic alterations with difused peritoneum exudate, adherences and no abscesses. The animals which developed peritonitis exhibited bilateral pleural effusion. On animals of group II and III which died, also were found the presence of Escherichia coli and Bacteroides fragilis responsible for peritonitis and pleural effusion. This model shows that the animal which received the highest bacterial concentrations showed loss of weight, clinical alterations of sepsis, acute peritonitis with pleural effusion and premature death.

Key Words: Peritonitis; Cavity abdominal punction; Bacterial inoculation

REFERÊNCIAS

1. Davis JH – Current concepts of peritonitis. *American Surgeon* 1967; 33:673.
2. Onderdonk AB, Weinstein WM, Sullivan NM, et al – Experimental intraabdominal abscess in rats: quantitative bacteriology of infected animals. *Infect Immun* 1974;10:1256-1259
3. Matlow AG, Bohnen JMA – Pathogenicity of enterococci in a rat model of fecal peritonitis. *Journal Inf Dis* 1989;169:142-145.
4. Rocha JJR – Infecção peritoneal: modelo experimental em cobaias. *Acta Cir Bras* 1986;1:12-20.

5. Baker CC, Gaines HO, Bave AE – Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. *Surgery* 1983;94:331-335.
6. Freire ANM, Kobata CM, Toledo RF, et al – Formação de abscesso experimental em ratos. *Acta Cir Bras* 1989;4:19-20.
7. _____ – Infecção peritoneal experimental em ratos. *Acta Cir Bras* 1989;1:20-21
8. Nichols RL, Smith JW, Balthazar ER – Peritonitis and intrabdominal abscesses: an experimental model for the evaluation of human disease. *Journal Surg Res* 1978;25:129-134.
9. Waitzberg DL, Oku SMM, Soares SRC, et al – Padronização de um modelo de peritonite em ratos. *Acta Cir Bras* 1991;6: 37-40.
10. Browne MK, Leslie, GB – Animal models of peritonitis. *Surg Gynecol Obstet* 1976;143:738 -740.
11. Bartlett JG, Onderdonk AB – Lessons from an animal model of intraabdominal sepsis. *Arch Surg* 1978;113:853-857.
12. Araújo Jr., JC – Avaliação do uso tópico da clorhexedina na peritonite fecal induzida em ratos. *Acta Cir Bras* 1987;2:55-67.
13. Saad F – Infecção peritoneal: modelo experimental em ratos. *Acta Cir Bras* 1986;1:10-18.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Dr. Gilton Angelo Guilgen
Rua Tadeu Morozowicz, 19
82010-660 – Curitiba – PR

XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA

4 A 8 DE JULHO DE 1999

RIOCENTRO RIO DE JANEIRO