

JANNAINA FERREIRA DE MELO VASCO

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA ENTRE CULTURA
SEMIQUANTITATIVA DE BIÓPSIA E CULTURA DE *SWAB* E SUA
CORRELAÇÃO COM ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS NAS
QUEIMADURAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setores de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Dra. Cristina Leise Bastos Monteiro

Co-orientadores: Dr. José Ederaldo Telles

Dr. José Eduardo Vianna

CURITIBA

2005

À minha família por sempre acreditar e confiar em mim. A Deus por sempre me fazer enxergar que com muito esforço, amor e dedicação tudo é possível.

AGRADECIMENTOS

À pessoa que esteve comigo desde o início da idealização deste trabalho, Dr. José Eduardo Vianna, que sempre me atendeu e muito colaborou com sua enorme experiência e dedicação. Meu enorme agradecimento, tanto por acreditar que conseguiríamos como por sempre lutar junto.

A toda a equipe da unidade de queimados, em especial à equipe do centro cirúrgico, nas pessoas do Dr Manuel Alberto Prestes, Dr Luiz Henrique A. Calomeno, Dr José Luiz Takaki, Dr José Cardoso de Azevedo (*in memoriam*), M^a Inês Geraldelo, Denise Weber, Sueli M Oliveira e as demais pessoas que ali dedicam todo seu profissionalismo nos cuidados aos pacientes queimados.

Aos orientadores, Cristina L. B. Monteiro e José Ederaldo Telles, pela atenção e dedicação dispensados a mim e a este trabalho.

Ao curso de Pós-graduação, na pessoa da coordenadora Vanete Soccol, que com garra dispensa muito amor e dedicação ao curso, mostrando que somos capazes, e em especial à professora Vânia A. Vicente, pelo enorme apoio na concretização deste desafio.

A todos os colegas do mestrado, em especial a Larissa Bail Terasawa, Keite S. Nogueira, Simone de Oliveira, Alexandre Rosa e Helena A. P. H. M de Souza, que sempre estiveram comigo e compartilharam as mesmas dificuldades e alegrias.

Ao setor de microbiologia do Hospital Evangélico de Curitiba, em especial à amiga e responsável pelo setor, Izabel de Quadros, que muito contribuiu com as análises microbiológicas. A todos os funcionários da Seção de Bacteriologia e Central de Soluções do Hospital de Clínicas, que ajudaram de maneira efetiva para a realização deste trabalho, em especial a colaboradora Dra Líbera M. Dalla Costa, pelo incentivo e pela demonstração de uma força sem igual.

Ao Núcleo de estudos de Bacteriologia de Curitiba – NEBaC e a Newprov, pelo efetivo apoio financeiro à execução deste trabalho, e ao Professor Carlos Augusto Albini, pelo fornecimento de materiais emergenciais e apoio moral ao crescimento das pesquisas.

À minha família, pelo incentivo e pela força que sempre me deram, acreditando em tudo que faço e torcendo por mim, e por aceitar e compreender a minha ausência nessa fase tão difícil para todos nós. Ao meu marido, Carlos G. Vasco, pelo amor, pela ajuda e pelo companheirismo, em todas as etapas do meu crescimento.

A todos os que deram suas parcelas de contribuição para a conclusão desta jornada.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE GRÁFICOS.....	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. OBJETIVOS	3
1.1.1. Objetivo Principal:	3
1.1.2. Objetivos Secundários:.....	3
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. FISIOPATOLOGIA DA QUEIMADURA	4
2.2. PROGNÓSTICO DA QUEIMADURA	5
2.3. PROFUNDIDADE DA QUEIMADURA.....	6
2.4. CÁLCULO DA SUPERFÍCIE CORPORAL QUEIMADA (SCQ).....	8
2.5. ETIOLOGIA DAS QUEIMADURAS	9
2.6. INFECÇÃO DA FERIDA POR QUEIMADURA.....	10
2.6.1. Métodos de Diagnóstico Laboratorial	12
2.6.1.1. Técnicas com amostras de tecido de ferida por queimadura	12
2.6.1.2. Técnicas com amostras de superfície de ferida por queimadura	15
2.6.1.3. Coloração de Gram	17
2.6.1.4. Cultura de amostras da ferida por queimadura	18
2.6.1.5. Testes de susceptibilidade	20
2.6.1.6. Resistência aos antimicrobianos	21
2.6.2. Principais Patógenos.....	23
2.6.2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
2.6.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	27

2.6.2.3. <i>Acinetobacter baumannii</i>	29
2.6.2.4. Outros patógenos associados com infecção em pacientes queimados ...	30
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	33
3.1. CASUÍSTICA E AMOSTRAS	33
3.2. MÉTODOS	36
3.2.1. Cultura Semiquantitativa de Shulman	36
3.2.2. Análise Histopatológica	37
3.2.3. Identificação das Espécies Bacterianas	40
3.2.3.1. Identificação de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40
3.2.3.2. Identificação de <i>Staphylococcus aureus</i>	41
3.2.3.3. Identificação de <i>Acinetobacter baumannii</i>	42
3.2.3.4. Identificação das enterobactérias	42
3.2.4. Teste de Suscetibilidade:	43
3.2.4.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) por Microdiluição em Ágar.....	44
4. RESULTADOS	50
5. DISCUSSÃO	66
6. CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
ANEXOS	92

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ATIVAÇÃO DE VIAS QUE CONTRIBUEM PARA O EDEMA TECIDUAL	5
QUADRO 2 - TÉCNICAS DE PREPARO DO FRAGMENTO DE BIÓPSIA PARA ESTUDO HISTOLÓGICO	37
QUADRO 3 - TESTES DE IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DAS AMOSTRAS DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> ISOLADAS.....	41
QUADRO 4 - TESTES DE IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DAS AMOSTRAS DE <i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i> ISOLADAS.....	42

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO CLÍNICA E HISTOLÓGICA DE UMA QUEIMADURA DE PRIMEIRO GRAU	7
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO CLÍNICA E HISTOLÓGICA DE UMA QUEIMADURA DE SEGUNDO GRAU	7
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO CLÍNICA E HISTOLÓGICA DE UMA QUEIAMDURA DE TERCEIRO GRAU	8
FIGURA 4 – DIAGRAMA DE LUND & BROWDER PARA CÁLCULO DA SUPERFÍCIE CORPORAL QUEIMADA, COM TABELA PARA AJUSTE DE ACORDO COM A IDADE	9
FIGURA 5 - ILUSTRAÇÃO DO PILI POLAR E FLAGELOS DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> QUE SÃO CARACTERÍSTICAS TÍPICAS DESSA BACTÉRIA.....	25
FIGURA 6 - <i>PUNCH</i> DE 4 MM UTILIZADO PARA RETIRADA DA BIÓPSIA	34
FIGURA 7 - ESQUEMA DA COLETA DE BIÓPSIA COM <i>PUNCH</i>	35
FIGURA 8 - FRAGMENTO DE PELE QUEIMADA EM FRASCO COM NaCl	35
FIGURA 9 - VISÃO PANORÂMICA DO CORTE DE PELE QUEIMADA COM O USO DE <i>PUNCH</i> (HE 4x)	38
FIGURA 10 - CORTE HISTOLÓGICO DE PELE QUEIMADA CORADO PELO GRAM-MOCIFICADO – VISUALIZAÇÃO DE BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS (GRAM 400x)	39
FIGURA 11 - ESQUEMA SIMPLIFICADO DO MÉTODO DE DILUIÇÃO EM ÁGAR.....	48
FIGURA 12 - ULCERAÇÃO TOTAL DA EPIDERME, NECROSE SUPURATIVA E INFLAMAÇÃO MODERADAS NA DERME (HE 40x E 200x).....	60
FIGURA 13 - AGRUPAMENTOS DE BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS DISPOSTAS NA DERME SUPERFICIAL (GRAM 1000x) (A, B). BACIOS GRAM-NEGATIVOS NA DERME SUPERFICIAL DISPOSTOS ENTRE FIBRAS COLÁGENAS (C) E NA LUZ DO FOLICULO PILOSO (D)	61

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - DISTRIBUIÇÃO DOS 70 PACIENTES DE ACORDO COM A IDADE E SEXO	50
GRÁFICO 2 - ETIOLOGIA DAS QUEIMADURAS E PROBABILIDADE ACUMULADA	51
GRÁFICO 3 - DISTRIBUIÇÃO DOS AGENTES DAS QUEIMADURAS EM RELAÇÃO À IDADE	52
GRÁFICO 4 - DISTRIBUIÇÃO DAS FAIXAS ETÁRIAS EM RELAÇÃO A SUPERFÍCIE CORPORAL QUEIMADA (SCQ)	53
GRÁFICO 5 - PORCENTAGEM DA QUANTIFICAÇÃO DE 57 BIÓPSIAS POSITIVAS.....	55
GRÁFICO 6 - FREQUÊNCIA E PORCENTAGEM ACUMULADA DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS DE 70 BIÓPSIAS	56
GRÁFICO 7 - REPRESENTAÇÃO DAS BACTÉRIAS ISOLADAS POR AGENTE ETIOLÓGICO DA QUEIMADURA.....	57
GRÁFICO 8 - FREQUÊNCIA DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS DE 70 AMOSTRAS DE CULTURA DE SUPERFÍCIE POR SWAB.....	58
GRÁFICO 9 - ANÁLISE DOS ACHADOS HISTOLÓGICOS EM COMPARAÇÃO COM OS RESULTADOS DE QUANTIFICAÇÃO DA CULTURA	63

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - SOLUÇÕES-ESTOQUE DE ANTIMICROBIANOS TESTADOS PARA CEPAS DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> , <i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i> E <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	45
TABELA 2 - PONTOS DE CORTE PARA <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> E <i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i> SEGUNDO CLSI E CONCENTRAÇÕES DOS ANTIMICROBIANOS TESTADOS	46
TABELA 3 - PONTOS DE CORTE PARA <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> , SEGUNDO CLSI, E CONCENTRAÇÕES TESTADAS	47
TABELA 4 - LIMITES ACEITÁVEIS PARA AS CEPAS CONTROLES, SEGUNDO CLSI 2005	49
TABELA 5 - RESULTADOS DE ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS.....	59
TABELA 6 - RESULTADOS DA POSITIVIDADE E ACHADOS DE INFECÇÃO DAS DUAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO POR BIÓPSIA.....	62
TABELA 7 - SENSIBILIDADE DAS AMOSTRAS DE <i>P. AERUGINOSA</i> E <i>A. BAUMANNII</i> E VALORES DE CIM50 E CIM90	64
TABELA 8 - SENSIBILIDADE DAS AMOSTRAS DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> E VALORES DE CIM50 E CIM90	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus centígrados
µg/ml	Microgramas por mililitro
µl	Microlitro
%	Por cento
AS	Ágar-sangue de carneiro
ASM	Sociedade Americana de Microbiologia
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Infusão Cérebro Coração
CCQ	Centro Cirúrgico de Queimados
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIM ₅₀	Concentração Inibitória Mínima para 50% das amostras
CIM ₉₀	Concentração Inibitória Mínima para 90% das amostras
CMV	Citomegalovírus
ECN	Estafilococos Coagulase Negativa
HE	Hematoxilina e eosina
HUEC	Hospital Universitário Evangélico de Curitiba
HC-UFPR	Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
LTD	L-tryptofano desaminase
MC	Ágar MacConkey
mg	Miligrama
MHA	Ágar Muller-Hinton
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina/oxacilina
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina/oxacilina
MSA	Ágar Manitol-salgado
NaCl	Cloreto de Sódio
CLSI/NCCLS	Clinical and Laboratory Standards Institute / National Committee of Clinical Laboratory Standards
pH	Potencial hidrogênio-iônico
sp	Espécie
spp	Espécies
SCQ	Superfície Corporal Queimada
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UI	Unidade Internacional
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFC/g	Unidades Formadoras de Colônias por grama
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
UFPR	Universidade Federal do Paraná
VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> com resistência intermediária à Vancomicina
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à Vancomicina
VRE	<i>Enterococcus</i> Resistente à Vancomicina
VM	Vermelho de Metila
VP	Voges Proskauer

RESUMO

O diagnóstico e a etiologia de uma infecção em queimados apresentam inúmeras dificuldades, sendo difícil determinar a presença e o grau de infecção na ferida. A frequência e a gravidade de complicações sépticas impõem a necessidade de um acurado diagnóstico e de uma apropriada terapêutica. O estudo avaliou as características microbiológicas da queimadura com o uso de biópsia, examinando a associação entre resultados de cultura semiquantitativa e achados histopatológicos. Foi coletado um total de 140 biópsias e 70 *swabs*, entre o sétimo e o nono dia após a queimadura, de 70 pacientes admitidos na unidade de queimados do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba (HUEC) - Curitiba-PR, no período de um ano. A biópsia, obtida com *punch* (4mm), foi encaminhada para análise microbiológica e histopatológica. Pela cultura semiquantitativa, o número de UFC/g de tecido foi obtido por meio da fórmula $N \times V \times v / W$, e foram consideradas como índice de infecção contagens $> 10^5$ UFC/g de tecido. Os resultados histopatológicos foram feitos pelas colorações de hematoxilina-eosina e de Gram, quanto à visualização de microrganismos no tecido necrótico e no tecido viável, indicando infecção. A predominância de homens (59%) foi observada em quase todas as faixas de idade, sendo o álcool (46%) o agente envolvido na maioria dos casos. A média do tamanho da queimadura foi de 32% SCQ. A taxa de mortalidade observada foi de 10%. Os microrganismos foram identificados e testados quanto à sensibilidade a antimicrobianos pelo método de microdiluição em ágar. *P. aeruginosa* (44%) foi o patógeno causador de infecção mais comum, seguido por *A. baumannii* (31%), *S. aureus* (13%) e outros (12%). As drogas mais ativas contra os microrganismos comumente isolados foram polimixina (100% de sensibilidade) para *P. aeruginosa*, e *A. baumannii* e vancomicina (100%) e linezolid (100%) para *S. aureus*. Infecções causadas por MRSA foram frequentes (67%) do total de *S. aureus*. Das 28 análises histológicas positivas 21 apresentaram infecção, e nessas, bactérias gram-negativas estiveram envolvidas em 81% dos casos. Concordâncias de 100% e 90% foram encontradas entre culturas negativas ou com baixos níveis de crescimentos e achados histológicos negativos, respectivamente. Em contraste, infecção histológica ocorreu em apenas 43% de amostras com cultura $> 10^5$ UFC/g de tecido. A boa concordância entre identificações histológicas e microbiológicas mostra que a cultura semiquantitativa e a análise histológica de biópsia poderiam ser vistas como adjuntas no entendimento de possíveis infecções no paciente queimado, fornecendo informações úteis com relação à quantificação da microbiota predominante, seus padrões de sensibilidade e sua profundidade, na ferida por queimadura.

Palavras-chave: Pacientes queimados; Infecção; Biópsia; Cultura semiquantitativa; Histopatológico.

ABSTRACT

The diagnostic and the etiology of infection in burned tissues present countless difficulties, being difficult to define the presence and the grade of the infection on the wound. The frequency and gravity of the sepsis complications impose the necessity of an accurate diagnosis and proper therapeutic. The study evaluated the microbiological characteristics of the burn wound by the usage of biopsy, examining the association between results from semiquantitative culture and histopathologic findings. It has been collected a total of 140 biopsies and 70 swabs, between the seventh and ninth day after of burned, of 70 patients admitted in the burning unit from Hospital Universitário Evangélico de Curitiba – Curitiba-PR (HUEC), during a period of one year. The biopsy has been obtained with punch (4 mm) and sent to microbiologic and histopathology analysis. Through semiquantitative culture the number of UFC/g of tissue was obtained by the $N \times V \times v/w$ formula, and considering as infection indication the countings with $> 10^5$ UFC/g of tissue. The histopathological results has been made by the hematoxylin-eosin(HE) and Gram colorations to the visualization of microorganisms in the necrotic tissue and viable tissue, indicating infection. The predominancy of men (59%) has been observed in most of age ranges, being alcohol (46%) the agent involved in most of cases, the medium size of burn wound were 32% of TSBA and the mortality rate observed reached 10%. The microorganisms has been identified and tested upon susceptibility to antimicrobial agents by agar dilution method. *P. aeruginosa* (44%) has been the pathogen more usual, causing infection, followed by *A. baumannii* (31%), *S. aureus* (13%) and others(12%). The most active drugs against the microorganisms commonly isolated were polymyx (100% of sensibility) to *P. aeruginosa* and *A. baumannii* and vancomycin (100%) and linezolid(100%) to *S. aureus*. Infections caused by MRSA were frequent (67%) of *S. aureus*. From the 28 positive histopathological analysis 21 has been infection, and in these gram-negative bacteria were involved in 81% of cases. Agreement of 100% and 90% has been encountered between negative cultures or low levels of growing and negative histologic findings, respectively. In contrast, histologic infection happened only in 43% of samples with culture $>10^5$ UFC/g of tissue. The good agreement between the histologic and microbiologic identifications show that the semiquantitative culture and the biopsy histologic analysis could be viewed as an adjunct in the understanding of possible infections in the burned patient, supplying useful informations with relation of predominant flora quantification, their standards of sensibility and the depth of this burn wound.

Key-words: Burns patients; Infection; Biopsy; Semiquantitative culture; Histopathological

1. INTRODUÇÃO

Os pacientes com queimaduras representam uma população altamente susceptível à infecção por microrganismos de origem endógena e exógena, como um resultado do rompimento da barreira normal da pele, acompanhado de uma depressão da resposta imune. Inicialmente a pele lesada é considerada livre ou virtualmente livre de bactérias, destruídas pelo calor. Porém, a grande quantidade de tecido necrótico, de exudatos ricos em proteínas, e a queda no suprimento de oxigênio proporcionam um excelente meio para o crescimento e a proliferação de microrganismos (EROL, 2004). A queimadura pode atingir total ou parcialmente a pele e seus anexos, podendo levar a um quadro de deficiência imunológica devido à formação de toxinas na pele queimada.

O diagnóstico e o estabelecimento da etiologia de uma infecção em paciente queimado apresentam inúmeras dificuldades. Na maioria das vezes é difícil determinar a presença e o grau de infecção na lesão por queimadura, a qual permanece como a principal causa de óbito, sendo estimado que 75% das mortes, em pacientes que sobrevivem ao período inicial de choque, estejam relacionadas à infecção invasiva (VINDENES, 1995). Porém, fatores associados ao paciente e ao microrganismo, tais como: idade, extensão da lesão termal, profundidade da queimadura, tipo e número de microrganismos, produção de enzimas e toxinas, além de motilidade, determinam a probabilidade de infecção invasiva da ferida (ARSLAN, 1999).

A característica da microbiota da ferida resultante da queimadura muda com o tempo. Inicialmente, os cocos gram-positivos são mais prevalentes, oriundos principalmente das glândulas sebáceas e de folículos pilosos, sendo substituídos gradativamente, até o final da primeira semana, por microrganismos gram-negativos oportunistas, que parecem ter uma maior propensão para invasão (NASSER, 2003; PRUITT, 1998). Os bacilos gram-negativos, comuns colonizadores da área queimada e subseqüentemente causa corrente de infecções nosocomiais, têm se tornado menos freqüentes nos últimos anos, devido ao uso de antimicrobiano tópico, particularmente para *Pseudomonas* spp.

Porém, *Pseudomonas aeruginosa* permanece a principal causa de colonização da lesão termal e de sérias infecções invasivas em feridas por queimadura. A seleção e a disseminação de mecanismos de resistência adquirida aumentam a probabilidade de colonização e subsequente infecção da ferida por espécies de *Pseudomonas* spp multiresistentes (LARI, 2000). Alguns fatores de virulência de espécies gram-negativas incluem toxinas (endo e/ou exotoxinas), enzimas proteolíticas, polissacarídeos extracelulares, tal como o muco produzido por certas cepas, e motilidade concebida pelos flagelos (MCMANUS, 1980). Adicionalmente, resistência a antimicrobianos, tanto intrínseca quanto adquirida, pode influenciar o curso da infecção, uma vez estabelecida (PRUITT, 1998), enquanto os cocos gram-positivos são reportados com aumentada freqüência em infecções nosocomiais, principalmente o *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente (MRSA).

A freqüência e a gravidade de complicações sépticas, em pacientes gravemente queimados, impõem a necessidade de um acurado diagnóstico e uma apropriada terapêutica. As técnicas de diagnóstico com biópsia, que envolve o exame histopatológico e a cultura, são fundamentais para a verificação de infecção invasiva e para avaliar o estado microbiológico da queimadura, identificando infecções causadas por bactérias resistentes ou microrganismos oportunistas (PRUITT, 1973). Enquanto as técnicas de cultura de superfície envolvem mais freqüentemente cultura por *swabs* o que permite uma análise qualitativa e semiquantitativa da microbiota da ferida por queimadura. Uma variedade de outras técnicas incluem discos com filtro de papel, placas de contato, almofada de veludo seca e pré-encharcada, sendo também utilizado amostras de fluidos da ferida. Essa vigilância da colonização da lesão queimada em uma unidade de queimados permite a administração de apropriada terapia antimicrobiana, depois da análise dos resultados da cultura, bem como a instalação de medidas de controle de infecção.

Apesar das técnicas de cultura com biópsia serem estudadas há muito tempo e de ser comprovada a sua eficácia, são muito pouco utilizadas, ou talvez nem o sejam, em unidades de queimados no Brasil.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo Principal:

Avaliar as características microbiológicas através de culturas da ferida por queimadura e correlacioná-las com achados histopatológicos quanto à profundidade e quantificação dos microrganismos nesses tecidos, para o diagnóstico de infecção.

1.1.2. Objetivos Secundários:

O presente estudo foi proposto para:

1. Estudar as características epidemiológicas dos pacientes com infecção clínica admitidos na unidade de queimados do HUEC – Curitiba-PR.
2. Demonstrar o valor da biópsia de tecido para o correto diagnóstico de infecção do paciente queimado.
3. Verificar a viabilidade do uso de uma técnica de cultura semiquantitativa de biópsia, em uma grande Unidade de Queimados, para identificar infecção bacteriana.
4. Analisar quantitativamente os padrões de colonização microbiológica da queimadura, utilizando como limiar contagens $> 10^5$ UFC/g de tecido para predizer infecção.
5. Verificar a prevalência dos microrganismos envolvidos em colonização e infecção da queimadura e seus padrões de susceptibilidade aos antimicrobianos.
6. Comparar microbiologicamente a cultura de biópsia e a cultura de superfície por *swab*.
7. Determinar a relevância do exame histopatológico de biópsia da ferida por queimadura com a ocorrência de infecção relacionada à invasão bacteriana tissular.
8. Confrontar a análise microbiológica e histopatológica com relação aos seus achados de quantificação e profundidade dos microrganismos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

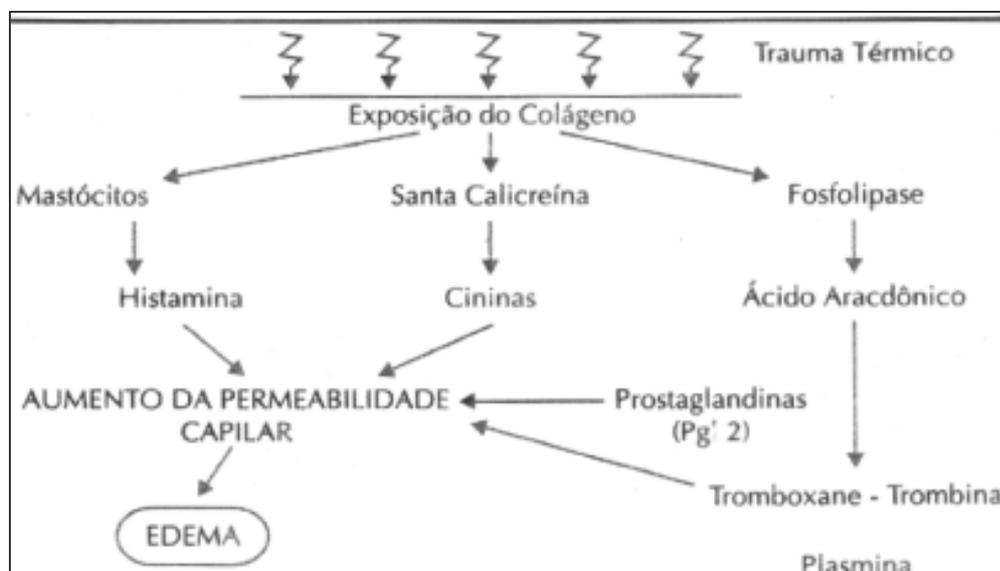
2.1. FISIOPATOLOGIA DA QUEIMADURA

Poderíamos resumir toda a fisiopatologia das queimaduras em poucas palavras, as quais seriam, sem dúvida, *Aumento da Permeabilidade Capilar (A.P.C.) e Edema*. (GOMES, 1995). Imediatamente após a queimadura, o fluxo sangüíneo, tanto arterial quanto venoso, é interrompido na zona de coagulação da pressão hidrostática e da permeabilidade capilar, em resposta à liberação de histaminas pelos mastócitos, resultando numa perda de líquidos, eletrólitos e proteínas para o espaço intersticial. Ocorre assim o edema, que é máximo na região atingida mas pode ocorrer também à distância, influenciado pela extensão da superfície corporal queimada (SCQ).

Em decorrência disso ocorre uma típica resposta inflamatória, que inter-relaciona os sistemas de coagulação, o sistema caliceína-cininas, o sistema fosfolipase-ácido aracdônico-prostaglandina e o renina-angiotensina, e o sistema complemento (QUADRO 1). Esses aumentam ainda mais a pressão hidrostática, a permeabilidade capilar e, conseqüentemente, o edema. O aumento de pressão colóido-osmótica desses tecidos agrava a retenção hídrica, enquanto o aumento da permeabilidade capilar permite a passagem, através de poros muito aumentados, não só de soluções cristalóides como também das soluções colóides, podendo sair partículas com peso molecular de até 150.000 Daltons para o espaço intersticial. E o importante edema dos tecidos afetados é um fator agravante de isquemia tecidual; portanto, esforços terapêuticos devem ser envidados para minimização desse processo infiltrativo (TOCANTINS, 1988).

Essa importante perda de líquidos, eletrólitos e proteínas, tanto para o interstício quanto para o meio externo, traz como conseqüência: desidratação, risco de choque hipovolêmico e complicações renais (LEMOS, 2003), além de proporcionar excelentes condições para o suporte de crescimento e proliferação de microrganismos. E assim, adicionalmente, a trombose termal que confere avascularidade à escara, além de promover a infecção por impedir a chegada de componentes celulares do sistema de defesa imune, limita a chegada de antimicrobianos na queimadura (BENNETT, 1998).

QUADRO 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ATIVAÇÃO DE VIAS QUE CONTRIBUEM PARA O EDEMA TECIDUAL



FONTE: TOCANTINS e GOMES, 1988.

2.2. PROGNÓSTICO DA QUEIMADURA

Vários são os fatores que influenciam o prognóstico e determina a maior ou menor gravidade de uma queimadura. Podemos citar alguns dos fatores que irão influenciar o prognóstico de uma maneira indireta, tais como a doença de base, o agente causal, o nível de imunossupressão do paciente, traumas associados à queimadura e até mesmo à idade do paciente, pois crianças menores de 2,5 anos e adultos com idade superior a 65 anos apresentam um pior prognóstico (TEPLITZ, 1980). Outro fator indireto de prognóstico e de morbidade é a lesão de vias aéreas por queimaduras. Mesmo em pacientes com superfície corporal queimada de pequena ou média intensidade, o índice de mortalidade nesses pacientes é bem elevado. As manifestações clínicas de queimaduras de vias aéreas são freqüentemente inaparentes nas primeiras 24 a 36 horas após a lesão. Importante edema da faringe pode se formar,

sendo imperativas a intubação orotraqueal e a ventilação mecânica. Broncoscopia com fibra óptica pode ser realizada para a confirmação do diagnóstico (GOMES, 1995).

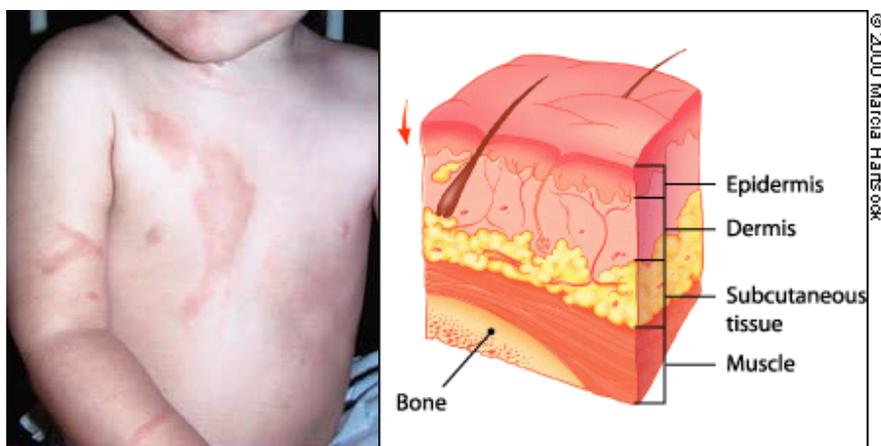
A extensão da superfície corporal queimada (SCQ) e a profundidade da lesão térmica também irão influenciar o prognóstico, porém a mortalidade cresce progressivamente após os 40% de área queimada (TEPLITZ, 1980). Esses são importantes fatores de risco para o desenvolvimento de infecção, podendo induzir resposta hipermetabólica, que é caracterizada pela mobilização de todos os substratos disponíveis, e leva a um quadro de deficiência imunológica, devido à formação de toxinas na pele queimada (ONCUL, 2002).

2.3. PROFUNDIDADE DA QUEIMADURA

A importância de se definir a profundidade da queimadura está no fato de o tratamento da ferida ser ditado por ela. Na prática clínica, essa profundidade é avaliada apenas pelo julgamento clínico (HEIMBACH, 1992). Para a correta determinação do grau da queimadura deve-se esperar de dois a três dias para que a lesão se defina melhor e possa ser feito um diagnóstico com menos erros. No entanto, a análise histopatológica de biópsia parece ser a ferramenta mais precisa no diagnóstico da profundidade da queimadura, como demonstrado por Papp *et al* (2004). em seu estudo experimental. Mas não se trata de uma técnica utilizada para a prática clínica, pois essa consome tempo e deixa uma cicatriz no sítio da biópsia (HEIMBACH, 1992). A complexidade das mudanças dinâmicas que ocorrem nos elementos celulares e parenquimais da pele, após a queimadura, têm resultado, no entanto, em dificuldades para se produzir uma técnica que concorra com as medidas histológicas de profundidade da queimadura (WATTS, 2001).

A lesão de primeiro grau é aquela que atinge a camada mais externa da pele, a epiderme; clinicamente, a região atingida encontra-se hiperemiada na ausência de bolhas ou flictenas (FIGURA 1). Este tipo de queimadura não provoca alterações hemodinâmicas, nem tampouco é acompanhada de alterações clínicas significativas.

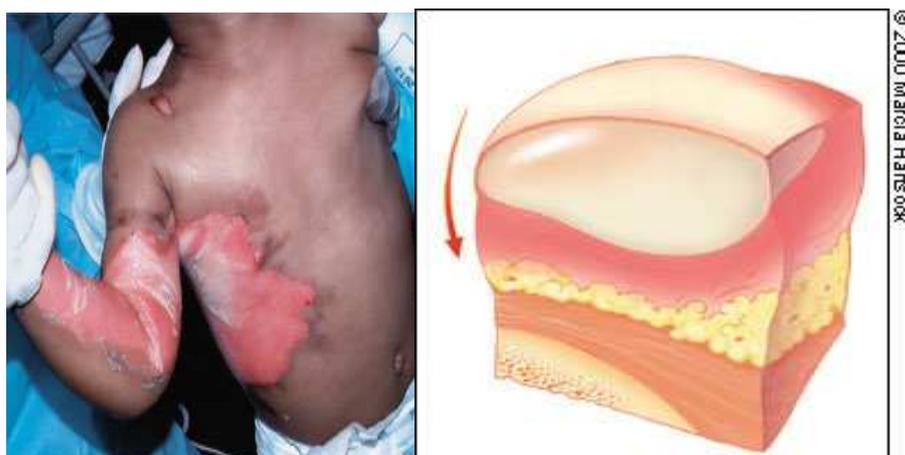
FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO CLÍNICA E HISTOLÓGICA DE UMA QUEIMADURA DE PRIMEIRO GRAU



FONTE: Morgan et al., 2000

As queimaduras de segundo grau envolvem a epiderme e parte da derme. Seu reconhecimento é simplificado, pois a característica clínica mais marcante é a formação das bolhas ou flictenas, apresentando dor intensa à manipulação (FIGURA 2).

FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO CLÍNICA E HISTOLÓGICA DE UMA QUEIMADURA DE SEGUNDO GRAU



FONTE: Morgan et al., 2000

Enquanto as de terceiro grau são aquelas que acometem a totalidade das camadas da pele (epiderme e derme), e em muitos casos outros tecidos tais como tecido

celular subcutâneo, músculos e tecido ósseo. Essa apresenta um aspecto esbranquiçado ou marmóreo; há redução da elasticidade tecidual, tornando-se rígida (FIGURA 3).

FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO CLÍNICA E HISTOLÓGICA DE UMA QUEIAMDURA DE TERCEIRO GRAU



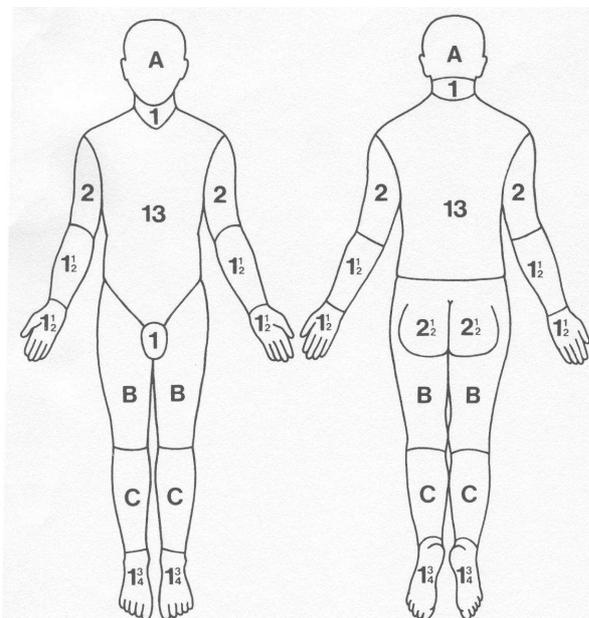
FONTE: Morgan et al., 2000

2.4. CÁLCULO DA SUPERFÍCIE CORPORAL QUEIMADA (SCQ)

A superfície corporal queimada é um dos principais fatores que influenciam na sobrevivência dos pacientes. A estimativa da extensão da área queimada pode ser feita usando-se a tabela de Lund & Browder (FIGURA 4), que leva em consideração diferentes proporções do corpo humano em relação aos diferentes grupos etários (MARCHESAN, 2005).

Um outro esquema muito utilizado e de fácil memorização é a Regra dos Nove de Kyle e Wallace (1951), devendo ser utilizada, nas emergências, como uma avaliação superficial. Essa regra imputa valor igual a nove ou múltiplos de nove às partes atingidas: 9% para cada membro superior e para a cabeça, 18% para cada membro inferior e para cada face do tronco, e 1% para a genitália.

FIGURA 4 – DIAGRAMA DE LUND & BROWDER PARA CÁLCULO DA SUPERFÍCIE CORPORAL QUEIMADA, COM TABELA PARA AJUSTE DE ACORDO COM A IDADE



<i>IDADE</i>	A <i>1/2 da cabeça</i>	B <i>1/2 da coxa</i>	C <i>1/2 da perna</i>
RECÉM-NASCIDO	9,50	2,75	2,50
00 a 01 ano	8,50	3,75	2,50
01 a 05 anos	6,50	4,00	2,75
05 a 10 anos	5,50	4,25	3,00
10 a 15 anos	4,50	4,50	3,25

2.5. ETIOLOGIA DAS QUEIMADURAS

As causas mais comuns de queimaduras são, por ordem de frequência, as escaldaduras por líquidos superaquecidos, acidentes com substâncias inflamáveis, por combustão, exposição direta à chama, contato com objetos aquecidos, queimaduras químicas, elétricas e outras (TOCANTINS, 1988). Crianças entre 1 a 5 anos de idade representam um alto risco, e o mecanismo predominante é a escaldadura acidental. Em adolescentes e adultos jovens, as queimaduras mais frequentes são resultados de acidentes com líquidos inflamáveis. Contudo, no grupo dos adultos a maioria são homens entre 17 a 30 anos de idade, e a principal lesão deve-se ao contato com fogo,

resulta do álcool, de abusos com drogas ou de doenças psiquiátricas preexistentes (KAO, 2000; MOZINGO, 1998).

A profundidade da lesão depende do agente etiológico envolvido e do tempo de exposição a ele. Assim, na escaldadura é em geral superficial, ao passo que na chama tende a ser mais profunda (LEMOS, 2003). Apesar da SCQ ser um dos fatores que influenciam o prognóstico de uma queimadura, nas elétricas geralmente se tem uma menor superfície corporal envolvida, mas os efeitos destrutivos são muito mais graves do que os das queimaduras térmicas. As queimaduras elétricas resultam da passagem da corrente elétrica pelo corpo do paciente, destruindo músculos, nervos e vasos sanguíneos, podendo resultar em profundas alterações do balanço ácido-base e na produção de mioglobinúria, acarretando sérias alterações da função renal (DINO, 1995). Sua gravidade depende da duração do contato (MARCHESAN, 2005). Queimaduras químicas são usualmente causadas por ácido sulfúrico ou ácido nítrico, e pelos álcalis, como soda cáustica ou amônia anidra. Geralmente as lesões por álcalis são mais graves do que as causadas por ácido, porque o álcali penetra rápido e mais profundamente (DINO, 1995).

Mudanças nos cuidados com a ferida, incluindo o uso de efetivos antimicrobianos tópicos e excisão precoce do tecido queimado para obter a melhor cicatrização da ferida resultante da queimadura, têm significativamente reduzido a ocorrência de infecção invasiva da ferida, e isso se relaciona com diminuição da morbidade e da mortalidade. Contudo, manifestações dos efeitos imunossupressores da queimadura, e infecções de outros sítios, predominantemente em pulmões, permanecem as principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes severamente queimados (MOZINGO, 1997).

2.6. INFECÇÃO DA FERIDA POR QUEIMADURA

A infecção é a maior complicação em feridas causadas por queimaduras. Estima-se que 75% das mortes seguidas da lesão termal sejam relacionadas a ela (REVATHI, 1998; VINDENES, 1995). O diagnóstico e a etiologia de uma infecção em um paciente

queimado apresentam inúmeras dificuldades. A colonização da escara e mesmo a bacteremia transitória são freqüentes, além do que os sintomas decorrentes da lesão podem simular um processo infeccioso (FERNANDES, 2004).

As queimaduras tornam-se infectadas porque o ambiente no sítio da ferida é ideal para a multiplicação de microrganismos. O estado imunossupressivo do paciente e a imediata falta de anticorpos é que permitem a livre multiplicação de potenciais patógenos na ferida (EDWARDS-JONES, 2003). Essa é susceptível à colonização por microrganismos originados de sítios exógenos ou endógenos, incluindo o meio ambiente hospitalar, os tratos gastrointestinais e respiratórios, os tecidos adjacentes não queimados ou as estruturas da profundidade dérmica (ELSAYED, 2003). Atualmente, tem-se acreditado que muitos casos de sepse são causados por fontes endógenas de contaminação bacteriana e que essas fontes estão localizadas principalmente na própria queimadura, em estruturas tais como: folículos pilosos e glândulas sebáceas. Já o papel das fontes exógenas não está claro, mas parece que, pelo controle da contaminação superficial e pela transmissão de bactérias exógenas como evidenciado pela contaminação cruzada, poderia ser marcadamente diminuído (BREUING, 2003).

A população microbiana da ferida por queimadura logo após a queimadura é rara e predominantemente se constitui de gram-positivos. Com o passar dos tempos, microrganismos gram-negativos colonizam a queimadura, e pelo fim da primeira semana esses prevalecem (AGNIHOTRI, 2004; NASSER, 2003). A colonização dessa ferida por microrganismos gram-negativos ocorre predominantemente por bactérias endógenas, devido às mudanças locais e gerais na microbiota da pele normal do paciente, as quais são agravadas pelo tratamento com o uso de antimicrobianos sistêmicos. O sistema gastrointestinal, por exemplo, é colonizado por patógenos, os quais colonizam a queimadura cinco dias após a lesão (BARRET, 2001).

O tipo de microrganismo presente na escara influencia a incidência de infecção invasiva. Infecções da ferida causadas por gram-positivos tendem a ser superficiais e a permanecerem localizadas (PRUITT, 1984). Porém, enzimas e outros produtos metabólicos produzidos pelos gram-negativos aumentam o potencial invasivo e a rápida expansão da infecção (BARRET, 2003). Além disso, muitos gram-negativos são

resistentes a antimicrobianos comuns, independentemente de esse microrganismo se originar do paciente ou do ambiente, o que faz com se torne difícil de ser erradicado, seja ele de qualquer das fontes (ONCUL, 2002). Estudos têm mostrado que a proliferação e a subsequente penetração desse tipo de bactéria na escara podem ser retardadas, ou ainda prevenidas, com o uso de agentes antimicrobianos tópicos. No entanto, as taxas de infecções locais e a sepse da ferida confirmam que a proteção provinda do tratamento com antimicrobianos tópicos é parcial (BARRET, 2003; SHARMA, 1981).

O quadro clínico desenvolvido pode sugerir o grupo de bactérias que está causando a infecção. As oriundas dos gram-positivos são freqüentemente acompanhadas de hipertermia, leucocitose e confusão mental, e na escara é observado um exudato purulento associado à celulite periescara. Com os gram-negativos há predominantemente hipotermia, leucopenia, intolerância à glicose, distensão abdominal e íleo, síndrome da angústia respiratória e oligúria; a confusão mental pode estar ausente. Na escara pode-se observar mudança de coloração para tons escuros, marrons ou violáceos (FERNADES, 2004).

2.6.1. Métodos de Diagnóstico Laboratorial

Em termos gerais, a análise microbiológica quantitativa e qualitativa da ferida por queimadura pode ser investigada em amostras de tecido (biópsia) ou em amostras do fluido da superfície (*Swabs*). A maioria dessas feridas é colonizada com microrganismos, e uma falha no isolamento deles provavelmente, pode ser uma consequência da utilização de falhas técnicas microbiológicas.

2.6.1.1. Técnicas com amostras de tecido de ferida por queimadura

A detecção de bactérias na queimadura, realizada em biópsia, tem sido reconhecida como um excelente método na determinação de densidade da carga

microbiana, da presença de patógenos invasivos e da invasão tecidual (EDWARDS-JONES, 2003; BOWLER, 2001). As técnicas mais usadas são cultura quantitativa e semiquantitativa por biópsia, exame histopatológico e, mais recentemente, dermoabrasão.

O método de cultura quantitativa, descrito por Loeb et al. (1974a), tem sido reconhecido por vários autores como indicador útil para diagnóstico e tratamento da infecção em pacientes queimados (ELSAYED, 2003; LAWRENCE, 1992; MCMANUS, 1987; PALLUA, 1999). Por essa técnica o tecido é obtido assepticamente e então pesado, homogeneizado, seriamente distribuído, e semeado em meios de culturas seletivos e não-seletivos, em condições aeróbicas e anaeróbicas, de maneira a fornecer informações quantitativas e qualitativas. Por se tratar de um método que envolve várias diluições, tornando-se, conseqüentemente, muito trabalhoso, Shulman et al. (1979) desenvolveram o método da cultura semiquantitativa, envolvendo o uso de 10 µl e 100 µl de homogeneizado de amostra, plaqueados em ágar sangue e ágar MacConkey, dependendo do peso da amostra. Buchanan et al. (1986), por sua vez, compararam a técnica padrão da cultura quantitativa com a da cultura semiquantitativa, a qual ofereceu reprodutibilidade, eficácia, rapidez e redução substancial de custos.

O uso de biópsia na avaliação quantitativa microbiológica produz informações precisas quanto ao tipo de infecção presente e a carga bacteriana, principalmente de feridas cobertas por tecido necrótico (STEER, 1996a). Por essa razão, sugere-se que a técnica de *swab*, uma das técnicas de cultura de superfície, não avalia a medida da densidade bacteriana abaixo da superfície da escara, falhando em predizer presença ou progressão de colonização, em razão da baixa correlação entre a microbiota superficial cultivada e a infecção do tecido profundo (BHARADWAJ, 1983; LOEBL, 1974b). Por isso cresce a importância da realização de biópsia no diagnóstico de infecção da ferida, podendo ser realizado exame histopatológico para identificação de invasão microbiana, e de cultura quantitativa para isolamento do microrganismo e realização de testes de susceptibilidade.

Pruitt e Foley (1973) têm reiterado a importância e a utilidade da biópsia de ferida resultante da queimadura para o diagnóstico de infecção microbiana. Os autores, ainda

sugerem uma detalhada classificação histopatológica da severidade da infecção. Essa análise é baseada em profundidade de penetração do microrganismo, presença de uma resposta inflamatória, evidência de invasão no tecido viável e identificação de envolvimento vascular (PRUITT, 1973). Tal biópsia diferenciará colonização de infecção invasiva da ferida por queimadura (EDWARDS-JONES, 2003). Como reportado por McManus et al. (1987), o exame histológico de biópsia de pele queimada é superior ao exame de cultura quantitativa, considerando-se o diagnóstico de infecção invasiva. Em alguns estudos, o exame histológico é um método utilizado para o diagnóstico de infecções fúngicas, pois o isolamento por cultura desses microrganismos tem um baixo rendimento. Além disso, técnicas para recuperação quantitativa de fungos em tecido são pouco desenvolvidas (DI LONARDO, 1993; PRUITT, 1973). Contudo, essa técnica não está disponível na maioria dos países em desenvolvimento (SJÖBERG, 2003).

Outra técnica envolvendo dermoabrasão, que foi recentemente descrita, a qual permite quantificar a colonização microbiana incluindo camadas mais profundas da ferida, ainda minimizando o grau de invasão no tecido em feridas. A amostra é obtida utilizando-se um instrumento rotativo de alta velocidade com um disco abrasivo de aço de tamanho pré-determinado. O disco é pesado e transferido para um caldo, e em seguida são realizadas diluições desse caldo (PALLUA, 1999). A técnica de dermoabrasão tem-se mostrado mais sensível, qualitativa e quantitativamente, que uma amostra de superfície. Contudo, a técnica requer equipamento especializado, e o trabalho de Pallua et al. (1999) excluiu investigação de bactérias anaeróbicas.

Estudos de quantificação bacteriana em lesões por queimaduras indicam que biópsias com contagens iguais ou superiores a 10^5 UFC/g de tecido são indícios de infecção invasiva da ferida. Os trabalhos de Robson e Hegger (1969), em particular, realizados há mais de três décadas e se baseiam em observações de um grupo que acredita que infecção aguda ou crônica da ferida existe quando a carga microbiana é de mais que 10^5 UFC/g de tecido. Mais recentemente Breidenbach e Trager (1995) demonstraram que a concentração crítica de bactérias $\geq 10^4$ UFC/g de tecido deve ser atingido causando infecção em ferida complexa. Os autores também observaram que a cultura quantitativa de tecido prediz a probabilidade de infecção da ferida mais

efetivamente do que cultura feita por *swab*. Culturas quantitativas de 10^5 ou mais UFC/g de tecido foram também associadas com uma elevada taxa de mortalidade de 75% (PRUITT, 1973).

Em alguns estudos, as concentrações de bactérias superiores a 10^5 UFC/g de tecido têm sido usadas como um criterioso diagnóstico, tanto de infecção invasiva quanto de septicemia (MCMANUS, 1987; WOOLFREY, 1981). Alguns outros estudos compararam o uso de biópsia e técnicas de coleta de amostras de superfície para predizerem sepse (SJÖBERG, 2003; STEER, 1996b; WILLIAMS, 1984). Loebl et al. (1974b) demonstraram que 88% de crianças e 63% de adultos com contagem maior que 10^4 UFC/g de tecido desenvolveram sepse, comparando-se com 44% de crianças e 41% de adultos com culturas de superfície positivas. Shulman et al. (1979) também associaram essa densidade com prognóstico para a realização de enxertos, demonstrado um importante efeito na redução dos custos hospitalares por evitar seu fracasso. Como a técnica de biópsia reduz a microbiota superficial a concentrações insignificantes (LEVINE, 1976), isso demonstra que os microrganismos que se desenvolveram na cultura refletem, de fato, a colonização do tecido profundo. Portanto, tem-se utilizado biópsia, na prática clínica, para avaliar a ferida como uma provável fonte de contaminação bacteriana, a qual se torna invasiva no paciente com clínica de sepse (MARVIN, 1975; PRUITT, 1973).

2.6.1.2. Técnicas com amostras de superfície de ferida por queimadura

Técnicas de amostras de superfícies muito freqüentemente envolvem o uso de *swab* de algodão, as quais possibilitam uma análise semiquantitativa e qualitativa da microbiota da ferida. O *swab* pode também ser usado para realizar uma análise quantitativa plena, desde que sejam dissolvidos e liberados todos os microrganismos associados, quando transferidos para um diluente apropriado. Apesar de seu uso em larga escala, na grande maioria dos centros que atendem queimados, principalmente no Brasil, há debates sobre o valor de técnicas de amostras com *swab* e o valor da limpeza da ferida antes de o *swab* ser realizado (BOWLER, 2001). Esses demonstram

que a limpeza da ferida é necessária com o objetivo de se evitar que a diversidade da microbiota presentes nesse tipo de ferida, torne mais complexo e problemático o isolamento e a identificação do verdadeiro patógeno.

Uma variedade de outras técnicas incluindo, discos de papel filtro, cilindro de esfrega, *swab* úmido e a almofada de veludo (“velvet pad surface”), têm sido usadas para amostras de fluido da superfície da ferida para análise microbiológica (WILLIAMS, 1984; GEORGIADÉ, 1970), havendo, então, argumentos em debate para o suporte do uso de amostras de superfície como um método útil para se acessar rotineiramente a microbiota das queimaduras. Essa é a opinião dos autores para o gerenciamento de rotina de feridas que são apenas clinicamente infectadas ou daquelas que não têm sinais clínicos de infecção mas estão deteriorando ou têm uma longa história de falha na cicatrização. Nessas situações, amostras de *swab* de superfície podem fornecer dados úteis a respeito da presença do potencial patógeno, da diversidade do microrganismo envolvido e, conseqüentemente, uma indicação da probabilidade do sinergismo microbiológico (BOWLER, 2001).

Uma amostra de *swab* pode prover uma estimativa semiquantitativa da carga microbiana (exemplo: escasso crescimento ou abundante crescimento, ou maior 10^5 UFC/ml), o qual é consideravelmente mais fácil de se realizar que uma análise quantitativa completa. A análise quantitativa da microbiota superficial pode também ter um papel para predizer o risco de infecção invasiva, vários estudos tem demonstrado a correlação entre cultura de superfície e cultura de biópsia.

Robson e Hegger (1969) argumentam enfaticamente que biópsias são essenciais para quantificação e determinação de infecção invasiva na ferida. O valor de culturas de superfície na avaliação de infecção de feridas tem sido questionado por Robson (1979). O autor defendeu que fluidos de ferida purulenta podem impedir o crescimento de microrganismos, ao passo que biópsia pode render significativamente números de bactérias se tais culturas forem feitas rotineiramente. Então, deve-se ter em mente que o tecido superficial pode abrigar uma diversidade de microrganismos aeróbicos e anaeróbicos, um ou mais dos quais podem invadir a profundidade do tecido, e é altamente improvável que tecido superficial fosse estéril enquanto tecido profundo

estivesse infectado. Contudo, técnicas não invasivas têm mostrado ser benéficas na determinação do número de microrganismos que estão na interface do tecido ou são causas de infecção.

Levine et al. (1976) demonstraram uma grande correlação entre cultura quantitativa de *swab* e de biópsia em feridas abertas, e similarmente Thomson e Smith (1994) demonstraram uma correlação entre uma contagem semiquantitativa de *swab* e a contagem quantitativa de biópsia. Lawrence (1985) também afirmou que bacteriologia quantitativa fornece pouca informação além daquela obtida de um *swab*, e que *swabs* com contagens maiores que 30 UFC indicam uma contagem na biópsia de $> 10^5$ UFC/g de tecido, enquanto Vindenes e Bjerkness (1995) concluíram que microrganismos invasivos na ferida espelham aqueles encontrados nas culturas de superfície por *swab*.

2.6.1.3. Coloração de Gram

A coloração de Gram é utilizada para classificar os microrganismos com base em suas características tintoriais, tamanho, forma e agrupamento de células. É um dos poucos testes em microbiologia clínica que pode auxiliar rapidamente no diagnóstico presuntivo de doenças infecciosas. É utilizado para verificar a qualidade do espécime clínico, com base no conteúdo de células somáticas. Bactérias e fungos são gram-positivos, gram-negativos ou gram-variáveis. A aparência gram-variável pode se dever ao excesso de descoloração, tempo de vida do microrganismo, influência de tratamentos antimicrobianos e outros fatores (MAZA, 1997). A descoloração insuficiente com álcool-acetona permite a retenção do cristal-violeta, o que dificulta a observação de bactérias Gram-negativas. Por outro lado, esfregaços obtidos de culturas velhas ou contendo numerosas bactérias mortas ou expostas à ação de antibióticos apresentam irregularidades na coloração. As bactérias gram-positivas perdem a capacidade de reter o cristal-violeta, apresentando-se gram-negativas, as quais podem se corar mais fracamente pela safranina, podendo simular a ocorrência de infecções mistas (gram-positivas / gram-negativas).

A morfologia da maioria das bactérias coradas com Gram é mais característica quando os esfregaços são preparados a partir de cultivos com 18 a 24 horas em caldo, período no qual as células bacterianas se encontram na fase logarítmica de crescimento. Com frequência, a morfologia é menos característica quando os esfregaços são preparados com base em colônias desenvolvidas na superfície de meios de ágar (KONEMAN, 2001), bem como quando essa coloração é realizada em cortes histológicos. A reação de coloração é dependente da composição da parede celular do microrganismo. A espessa camada de peptidoglicano e de ácido teicóico encontrada em microrganismos gram-positivos causa resistência à descoloração com álcool-acetona. Esses microrganismos retêm o corante cristal violeta e adquirem a coloração púrpura. As paredes celulares ricas em lipopolissacarídeos dos microrganismos gram-negativos são rompidas pelo álcool-acetona, e o cristal violeta é liberado da fina parede celular. O contracorante safranina ou fucsina pode, então, ser visto conferindo ao organismo gram-negativo a coloração rosada (MAZA, 1997).

Amostra coletada com *swab*, aspirados, exsudatos, escarro, líquor ou outros fluidos orgânicos, urina jato médio sem centrifugação, biópsias ou fragmentos de tecido etc. podem ser analisados pelo Gram. Em algumas situações não são observados microrganismos, embora ocorra desenvolvimento na cultura; tal fato se justifica pela baixa concentração dos microrganismos existentes na amostra. Quantidades inferiores a 10^5 UFC/ml freqüentemente não são visualizadas na microscopia comum, com aumento de 1000x (imersão). A coloração de Gram apresenta sensibilidade em torno de 90% para as mostras com contagens superiores a 10^5 UFC/ml (STINGHEN, 2003). No entanto, informações baseadas nessa técnica podem não ser suficientes para guiar possíveis mudanças de quimioterapia antimicrobiana ou implementação de apropriadas medidas de controle de infecção (ELSAYED et al., 2003).

2.6.1.4. Cultura de amostras da ferida por queimadura

A análise de culturas de bactérias de biópsia e de *swabs* em queimados é uma importante ferramenta para a avaliação da severidade de infecções da queimadura,

porque permite uma avaliação quantitativa e qualitativa do patógeno no tecido (BREUING, 2003). A maioria dos microrganismos das infecções cultivados em queimaduras cresce aerobicamente, em 24 a 48 horas no ágar sangue ou no ágar MacConkey, assegurando que potenciais patógenos não sejam perdidos (TREDGET, 2004), incubados a uma temperatura de 35° C. As identificações podem ser feitas com razoável facilidade (ROSSOLINI, 2005), utilizando técnicas microbiológica padrões.

Pseudomonas aeruginosa produz um brilho metálico no ágar sangue, e as colônias freqüentemente desenvolvem um buraco aparente (devido à produção de bacteriocina), provocado pela prolongada incubação. *Pseudomonas aeruginosa* e bacilos gram-negativos móveis (com flagelo polar) constituem um não-fermentador da lactose e apresentam uma colônia branca no ágar sangue ou clara no ágar MacConkey. Geralmente, observa-se um odor frutificado, devido à produção de compostos de piocianina. *Pseudomonas aeruginosa* é oxidase positiva, com fluorescência sob onda longa de luz ultravioleta, crescimento a 42° C, e crescimento em ágar cetrimide. Essas características são suficientes para diferenciar *Pseudomonas aeruginosa* das outras pseudomonas e dos outros bacilos gram-negativos não fermentadores (TREDGET, 2004).

Quanto ao isolamento de *Staphylococcus aureus*, o uso de ágar manitol salgado (MSA) é indicado. Assim, cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multiresistentes não ocultarão o crescimento de *Staphylococcus aureus* nesse meio, como poderia acontecer em meios não seletivos. As espécies de *Staphylococcus* produzem colônias características em ágar sangue de carneiro. A maioria apresenta colônias que crescem rápido, com 1 a 2 mm de diâmetro após 24 horas de incubação, embora algumas espécies passam formar colônias menores durante esse período. As colônias de *S. aureus* são usualmente lisas, butirosas e convexas, com borda contínua, podendo produzir um pigmento amarelo ou amarelo-alaranjado (KONEMAN, 2001). Para identificação de *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente (MRSA), todos os *Staphylococcus aureus* isolados deverão ser inoculados em placas contendo oxacilina e sal (6 µg/ml de oxacilina e 4% de NaCl). Os isolados que crescerem depois de 48 horas de incubação a 30 ± 1° C serão considerados MRSA (FUCHS et al., 2002).

2.6.1.5. Testes de susceptibilidade

Uma vez estabelecido o diagnóstico de infecção, há necessidade de mudança em ambas as terapias, local e sistêmica, que podem ser instituídas por meio da análise do respectivo teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (FUCHS, 2002). Os testes de sensibilidade são indicados para qualquer organismo que contribua para um processo infeccioso que justifique quimioterapia antimicrobiana, se sua sensibilidade não puder ser predita, de maneira confiável, a partir da identificação do organismo. Os testes de sensibilidade são iniciados, com mais freqüência, quando se acredita que o organismo causativo pertence a uma espécie capaz de apresentar resistência aos agentes antimicrobianos mais freqüentemente usados. Os mecanismos de resistência incluem a produção de enzimas que inativam as drogas, a alteração do sítio-alvo das drogas e a alteração da absorção ou do efluxo das drogas. Os testes de sensibilidade também são importantes nos estudos da epidemiologia da resistência e de novos agentes antimicrobianos (CLSI/NCCLS, 2005).

Ensaio convencional de sensibilidade incluem técnicas de disco difusão, tal como o teste de Kirby-Bauer e microdiluição em ágar de culturas de células, tal como a concentração inibitória mínima (CIM). A técnica de disco difusão envolve a aplicação de um inóculo padronizado de bactérias e subsequente colocação de um disco impregnado com antimicrobianos em uma placa de Petri, contendo, de preferência, ágar Mueller-Hinton. A placa de Petri é incubada por 16-18 horas a 35° C, depois da qual uma zona de inibição ao redor de cada disco é medida. Os valores da zona de inibição são comparados a tabelas padrões, e uma avaliação é então feita quanto ao grau de susceptibilidade. Esses testes não fornecem informações se a inibição é de um efeito bacteriostático ou bactericida (TREDGET, 2004).

O disco difusão é o método mais utilizado para testes de susceptibilidade em laboratórios, classificando as cepas como susceptíveis, intermediárias ou resistentes a vários antimicrobianos. É também bastante usado para a detecção de isolados de MRSA heteroresistentes. Para tal fim a temperatura, nesse teste, tem um profundo efeito, pois a maioria dos isolados de MRSA com resistência heterogênea que crescem a 37° C parecem ser sensíveis à metilina, enquanto, se a temperatura de incubação

diminuir para 25° C ou 30° C, o número de isolados de MRSA aumentará, devendo a incubação ser realizada a 35° C, que é a ótima para testes de susceptibilidade em *S. aureus*. MRSA com resistência heterogênea é também um fenômeno tempo-dependente. Prolongadas incubações, por exemplo de 48 horas, são recomendadas para sua ótima detecção. Apesar desse ser um tempo ótimo, 24 horas é um período de incubação aceitável para ser usado na rotina dos laboratórios. Esse método é também afetado pelo pH, e a detecção é suprimida em pH 5.2, devendo ser realizado em pH alto (CUNHA, 2005).

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) obtida usando-se o teste de diluição pode mostrar ao médico a concentração do agente antimicrobiano necessária no sítio da infecção, para inibir o organismo infectante. As CIMs têm sido determinadas usando-se concentrações derivadas, tradicionalmente, de diluições 2X em série indexadas à base 1 (ex., 1, 2, 4, 8, 16µg/mL, etc.). Utilizam-se também outros esquemas de diluição, incluindo o uso de apenas duas concentrações bem separadas, ou de “ponto de corte”, ou concentrações entre os valores usuais (ex., 4, 6, 8, 12, 16µg/mL). Sempre que os resultados da CIM forem relatados aos clínicos com a finalidade de orientar a terapia, esses resultados devem ser acompanhados por uma categoria de interpretação (ex., sensível, intermediária, ou resistente).

A principal vantagem do método de diluição em ágar por concentração inibitória mínima é o resultado quantitativo; no entanto, por se tratar de uma metodologia um pouco trabalhosa, não é adotada como rotina na maioria dos laboratórios.

2.6.1.6. Resistência aos antimicrobianos

O ambiente hospitalar é o principal foco para o surgimento e a disseminação de bactérias multiresistentes. As freqüentes introduções de novos antimicrobianos no cenário clínico resultam em contínuas mudanças dos padrões de resistência entre os patógenos. A relação direta entre o uso de agentes antimicrobianos e a prevalência de bactérias resistentes tem sido documentada em várias ocasiões, especialmente nas UTIs. O processo seletivo de agentes antimicrobianos é o principal fator no surgimento

de resistência entre bactérias. Mais ainda, concentrações abaixo do ideal de antimicrobianos em lesões por queimadura provêm ótimas condições para colonização de cepas multiresistentes e subsequente disseminação (OGLE, 1988). Resistência a drogas em bactérias pode ser ainda adquirida por plasmídeos ou pela seleção de mutantes resistentes (RAM, 2000); contudo, a análise dos plasmídeos não é fácil de ser realizada (CHITKARA, 1973).

Resistência a múltiplas drogas é comum entre os agentes causadores de infecções da lesão por queimadura (RASTEGAR LARI, 1998), deixando poucas opções ou opções não efetivas de tratamento para o clínico. *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina (MRSA) é agora a maior causa de infecção nosocomial na Europa e está aumentando sua prevalência em unidades de queimados por todo o mundo. Ao lado do MRSA, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* multiresistentes a drogas, e atualmente *Enterococcus* spp resistente à vancomicina (VRE) está aumentando, entre os isolados. Esses causam um grande problema para o paciente e para a equipe, pois é difícil a erradicação da infecção. Mais perigosa ainda é a aumentada resistência de *S. aureus* para vancomicina, que tem recentemente sido reportada. Se essa cepa se tornar prevalente em unidades de queimados não existirão antimicrobianos efetivos para eventos de septicemia (EDWARDS-JONES, 2003; GANG, 1999). Por esse motivo, o uso de vancomicina (HOLDER, 1998), bem como de outros antimicrobianos, deve ser prudente (FUCHS, 2002).

Para *S. aureus*, linezolid está disponível para administração oral e é efetivo no tratamento de infecções por MRSA. Vancomicina tem sido menos usado, devido aos efeitos colaterais, como aumento de resistência e aparecimento de isolados de *Staphylococcus aureus* com resistência intermediária à Vancomicina (VISA) e *Staphylococcus aureus* resistente à Vancomicina (VRSA) (CUNHA, 2005). Dentre os gram-negativos o imipenem é uma das drogas mais efetivas, principalmente para o tratamento de *Pseudomonas aeruginosa*. Porém, a ocorrência de resistência ao imipenem tem sido crescentemente reportada (ALTOPARLAK, 2004; OZKURT, 2005). Ozurt et al. (2005) demonstraram que a presença, em pacientes, de *Pseudomonas aeruginosa* sensível ao imipenem é determinado como um fator de risco, pois

Pseudomonas aeruginosa tem a habilidade de desenvolver resistência a drogas durante a terapia. Essa resistência aos carbapenens é de interesse clínico, desde que essa droga pode representar a última escolha no tratamento de infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. A aquisição de metalo-beta-lactamases entre bactérias gram-negativas não fermentadoras representa um risco epidemiológico, por dois motivos: (1) metalo-beta-lactamases conferem resistência não apenas aos carbapenens, mas teoricamente a todos os β -lactâmicos, e são freqüentemente associados com resistência aos aminoglicosídeos, e (2), os genes que codificam as enzimas metalo-beta-lactamases são comumente carregam elementos móveis que podem se disseminar horizontalmente entre as cepas (LUZZARO, 2004). Altoparlak et al. mostraram, em 2005, que os isolados dessas duas bactérias produtoras de metalo-beta-lactamases são mais prevalentes em centros de queimados que em outras unidades.

A freqüente alta resistência aos antimicrobianos, como já mencionado, indica a necessidade de urgentes medidas para se restringir à expansão de espécies multiresistentes em unidades de queimados. Esses métodos incluem isolamento de pacientes contaminados, sensível restrição na administração de agentes antimicrobianos e procedimentos higiênicos de desinfecção (TREDGET, 2004).

2.6.2. Principais Patógenos

Na pele normal os microrganismos gram-positivos são os residentes mais comumente isolados, enquanto os gram-negativos não são usualmente encontrados em áreas de pele seca, mas estão associados com áreas úmidas e intertriginosas, como axila, virilha e outros. Como a lesão térmica destrói a barreira cutânea, ocorre progressiva colonização bacteriana no tecido desvitalizado, inicialmente por germes gram-positivos, e aproximadamente no final da primeira semana são gradualmente substituídos por gram-negativos (AGNIHOTRI, 2004; NASSER, 2003). Esses microrganismos comumente envolvidos em infecção invasiva da ferida por queimadura incluem, principalmente, não estão limitados a, *Pseudomonas aeruginosa*,

Acinetobacter spp, membros da família *Enterobacteriaceae* (como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, e *Proteus mirabilis*), *Staphylococcus aureus* (incluindo cepas oxacilina resistente – MRSA), *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus* spp (incluindo cepas resistentes à vancomicina), anaeróbios, *Candida* spp, *Aspergillus* spp, e agentes virais tais como vírus *Herpes* simples e *Citomegalovirus* (NASSER, 2003; PRUITT, 1998; VINDENES, 1995; REVATHI, 1998).

O tipo de bactéria que coloniza e infecta pacientes queimados e seus padrões de sensibilidade é altamente variável entre unidades de queimados, e é grandemente influenciado pelo uso de antimicrobianos tópicos e por políticas nos cuidados à ferida, bem como pelo uso de antimicrobianos sistêmicos.

2.6.2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

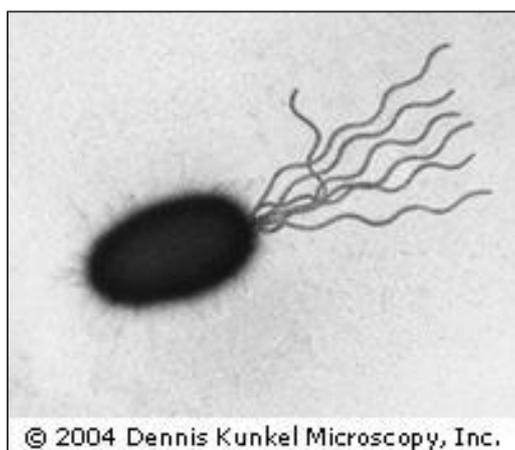
Pseudomonas aeruginosa é o principal patógeno causador de colonização da lesão queimada e de sérias infecções da ferida, permanecendo uma causa importante de sepse, morbidade e alta mortalidade em pacientes queimados (ROSSOLINI, 2005). O significativo aumento da incidência de *Pseudomonas aeruginosa* durante a primeira semana de admissão, em comparação com o dia da admissão, sugere uma origem nosocomial, e também sugere um perigo para a distribuição de infecções futuras entre os pacientes internados, sendo essa bactéria um dos líderes causadores de infecções nosocomiais (RASTEGAR LARI, 1998).

Ocasionalmente, *Pseudomonas aeruginosa* coloniza 5% a 10% dos sítios do corpo humano, com uma preferência para áreas úmidas (FERNANDES, 2004). A prevenção da colonização por *Pseudomonas aeruginosa* é usualmente baixa, mas altas taxas de colonização podem ser encontradas após a hospitalização. A colonização mais comum é em trato respiratório de pacientes sob ventilação mecânica, em trato gastrointestinal e na pele de pacientes queimados (BOWLER, 2001). Esses microrganismos podem ser originados de sítios exógenos ou endógenos, incluindo o meio ambiente hospitalar, e tecidos adjacentes não queimados ou de estruturas da profundidade da pele (ELSAYED, 2003), sendo que 70% de todas as queimaduras são

colonizadas por essa bactéria em três semanas, e a incidência de infecção aumenta em pacientes com queimaduras que cobrem mais de 30% da superfície corporal (SHARMA, 1981).

Os mecanismos de virulência de *Pseudomonas aeruginosa* são complexos e apenas parcialmente entendidos. Aderência mediada por pili e por outras adesinas parece ser característica morfológica importante para a colonização de membranas, mucosas e de outras superfícies (PRINCE, 1992), enquanto a produção de uma matrix exopolissacarídica mucóide que rodeia as células e ancora umas nas outras é importante para o crescimento como um biofilme, no qual as células bacterianas são protegidas das defesas inata e imune, e tornam-se menos susceptíveis aos antimicrobianos (ONSON, 2002). Um importante papel para o dano tecidual e a invasão tem sido reconhecido para um número de produtos secretados por *Pseudomonas aeruginosa*, incluindo: elastase, protease alcalina, citotoxina, fosfolipase C e rhamnolipídio. Finalmente, a toxicidade local e sistêmica está provavelmente mais relacionada à liberação de endotoxina e à produção de exotoxina A (uma enzima extracelular que inibe a síntese de proteína), e exotoxina S (VASIL, 1999). Essas bactérias também possuem flagelos, considerados como importante característica morfológica na virulência em pacientes queimados (FIGURA 5).

FIGURA 5 - ILUSTRAÇÃO DO PILI POLAR E FLAGELOS DE *Pseudomonas aeruginosa* QUE SÃO CARACTERÍSTICAS TÍPICAS DESSA BACTÉRIA



FONTE: EHA Consulting Group

Evitar ou retardar infecções por *Pseudomonas aeruginosa* provoca grandes benefícios quanto à morbidade e à mortalidade, especialmente quando o tamanho da lesão e a idade do paciente queimado aumentam (LEE, 1990). PRUITT et al., em 1998, documentou que nos 57 casos de infecção invasiva da ferida houve 26 casos de bacteremia secundária por *Pseudomonas aeruginosa*. Severas infecções ou bacteremia estão associadas a altas taxas de mortalidade, e são freqüentemente difíceis de serem tratadas, pois a quantidade de agentes antimicrobianos usados contra *Pseudomonas aeruginosa* é limitada; além do mais, esse microrganismo exibe notável habilidade para adquirir resistência a esses agentes (ROSSOLINI, 2005).

Sabe-se que a mortalidade e a morbidade, associados à infecção em pacientes queimados, estão bem relacionados à idade do paciente, à área total da queimadura (SCQ) e à presença ou à ausência de concomitante lesão inalatória (TREDGET, 2004). Contudo, Herruzo-Cabrera et al. (1996) reportaram que a longa estada no hospital foi o principal fator de risco para infecção na queimadura. Muitas pesquisas das causas das infecções, em centros de queimados, incluem na lista de microrganismos o *S. aureus* resistente à oxacilina (MRSA) como o patógeno mais freqüente causador de infecção na lesão por queimadura e no enxerto (REARDON, 1998; PRASANNA, 1998), mas esses microrganismos raramente levam à mortalidade (TAYLOR, 1992). Contudo, bactérias gram-negativas, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp, *Klebsiella* spp, bem como *E. coli* são as maiores causas de morte em centros de queimados (TREDGET, 2004). McManus et al., em 1985, sugeriu que 10% de todos os pacientes queimados desenvolvem bacteremia por *Pseudomonas aeruginosa*, acarretando uma taxa de mortalidade de 80%.

Em queimados essa morbidade e mortalidade podem ser reduzidas por medidas adotadas para se evitar infecção nosocomial ou para se retardar o início de infecção o mais distante possível. A cuidadosa lavagem das mãos, antes e após o manuseio com o paciente são indispensáveis na prevenção e no controle da transmissão de resistência cruzada a antimicrobianos, entre bactérias (REVATHI, 1998). Contínua vigilância de infecções em unidades de queimados é muito importante, pois novos microrganismos resistentes podem ser rapidamente isolados e confinados, e contínuas

manutenções do ambiente e educação do pessoal devem ser feitos (ROBERTS, 2001). Alguns estudos têm mostrado os benefícios do isolamento de pacientes queimados em quartos simples, para a diminuição do risco de contaminação cruzada e subsequente infecção (ONCUL, 2002; TANEJA, 2004). Isso, no entanto, pode não ser possível em alguns centros, devido à limitação dos recursos.

2.6.2.2. *Staphylococcus aureus*

A colonização por *Staphylococcus aureus* está freqüentemente associada à demora na cura da ferida, a um aumento na necessidade de intervenções cirúrgicas e ao prolongado tempo de internação (KOOISTRA-SMID, 2004). A transmissão ocorre envolvendo o paciente e o pessoal em contato com eles. Colonização nasal e da orofaringe dos pacientes, bem como dos trabalhadores da saúde em centros de queimados representam um importante papel na colonização da ferida por queimadura com essa bactéria (TAYLOR, 1992).

Desde a década de 70, *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente (MRSA) tem sido reportado como uma causa de epidemias em hospitais por todo o mundo (LESSEVA, 1996). O primeiro isolado de MRSA foi citado, em meados de 1961, quando a metilina foi introduzida como um antibiótico antiestafilococos, rapidamente substituída por uma penicilina antiestafilococos menos tóxica, como a oxacilina. Por essa razão, bem como pela maior estabilidade a oxacilina tornou-se o antibiótico usado para a detecção de resistência à metilina. Cepas de *Staphylococcus aureus* reportados como oxacilina resistentes são metilina resistentes. Essas cepas têm-se mostrado mais virulentas que o *Staphylococcus aureus* oxacilina sensível (MSSA) e vêm causando o mesmo espectro de infecção (CUNHA, 2005). O MRSA coloniza narina e pele, bem como a secreção respiratória de pacientes sob ventilação mecânica, e quando carregado nas mãos do pessoal médico é um importante fator para a disseminação de paciente para paciente (BERNAL, 2000; CUNHA, 2005).

Hoje, MRSA é a causa mais comum para infecção nosocomial severa, em todo o mundo (VOSS, 1994). Nos últimos anos, a porcentagem de pacientes com infecção por

MRSA tem aumentado drasticamente (TAYLOR, 1992). Várias epidemias têm ocorrido, principalmente em unidades de queimados, e estudos epidemiológicos têm sido realizados envolvendo amostras de pessoas, de pacientes e do ambiente hospitalar, na tentativa de elucidar os mecanismo de transmissão (RUTALA, 1983). Muitas dessas epidemias têm envolvido disseminação inter-hospitais, de pacientes colonizados ou de pessoal médico para outros pacientes (ONCUL, 2002), resultando em mais episódios de epidemias ou níveis variáveis de colonização/infecção nas instituições. Pacientes colonizados em hospitais, quando recebem alta hospitalar, podem carrear cepas para sua comunidade e então colonizar ou infectar pacientes não-hospitalizados. O oposto (pacientes colonizados ou infectados em comunidades) pode provocar a introdução de MRSA no hospital, quando da admissão de pacientes (CUNHA, 2005).

Pacientes com extensas lesões por queimadura são especialmente susceptíveis à colonização por MRSA, causada pela perda da barreira da pele e pela redução da capacidade imunológica (COOK, 1998). Um problema adicional é causado pela sobrevivência intracelular de *Staphylococcus* spp em leucócitos polimorfonucleares, pois a função bactericida dessas células está aumentada nas queimaduras, permitindo, assim, a sobrevivência da bactéria por mais tempo (FUCHS, 2002). Outros fatores como fibronectina, fibrinogênio, colágeno e muitos outros compostos são expostos à superfície dessas feridas. Muitas espécies de bactérias podem ser receptoras para tais moléculas, e assim rapidamente a superfície da ferida é colonizada. *Staphylococcus aureus* codifica muitas proteínas que interagem especificamente com componentes da matriz celular de humanos. Esses componentes da superfície do microrganismo reconhecem moléculas adesivas, tornando essas bactérias entre as mais comuns encontradas como colonizadoras da ferida resultante da queimadura (KOOISTRA-SMID, 2004).

Uma importante fonte de infecção é o próprio paciente, nos casos de prévia colonização, carregando *Staphylococcus aureus* para a lesão termal. Nesses casos, a colonização pode ser classificada como endógena. As outras fontes de colonização, tão importante quanto elas, são os trabalhadores das unidades de queimados. Especialmente, pacientes que não se apresentam colonizados por essa bactéria no

momento da admissão são propensos a se tornarem infectados por meio do contato com essas pessoas. Nesse caso, a colonização é classificada como exógena. A rota da transmissão endógena pode ser bloqueada pelo tratamento com antimicrobiano nasal tópico, em todos os pacientes admitidos, enquanto a infecção cruzada pela via exógena pode ser evitada ou reduzida pela adequada lavagem ou higienização das mãos (KOOISTRA-SMID, 2004; LESSEVA, 1996). No entanto, é difícil erradicar a colonização por MRSA, pois no tratamento poucos antimicrobianos atuam contra essas bactérias, podendo ser constatado que aumento na prevalência de MRSA é evidente em instituições com uso excessivo de antimicrobianos.

2.6.2.3. *Acinetobacter baumannii*

Um grande número de centros de queimados tem visto um aumento de infecções por *Acinetobacter* spp, principalmente *Acinetobacter baumannii*, microrganismos de origem nosocomial (TREDGET, 2004; HERRUZO, 2004). Recentemente, Wisplinhoff et al. (1999) demonstraram que *Acinetobacter baumannii* era endêmico em 367 pacientes com grandes queimaduras, e desses, 29 pacientes desenvolveram bacteremia. Eles foram comparados com 58 controles não infectados, entre os quais as taxas de mortalidade foram de 31% versus 14%, respectivamente, com duas mortes diretamente relacionadas à infecção por essa bactéria. Apesar de sua patogenicidade não ser tão alta, observações sugerem que essa espécie pode causar macerações em enxertos de pele (LAWRENCE, 1992).

Acinetobacter baumannii é um microrganismo não fermentador, usualmente resistente aos antimicrobianos, principalmente β -lactâmicos e carbapenens (WONG, 2002). Essa resistência aos carbapenens é de grande interesse clínico, uma vez que essa droga pode representar a última escolha no tratamento de infecções, que ameaçam a vida, causadas por essa bactéria, sendo essencial a pesquisa de metalo- β -lactamase para todos os isolados resistentes aos carbapenens (ALTOPARLAK, 2005). A longa hospitalização foi considerada como fator de risco para a multiresistência do *Acinetobacter baumannii* em uma unidade de queimados (WONG, 2002). Esse

microrganismo pode ser adquirido da microbiota endógena ou pode ser transmitido de fontes exógenas, e subseqüentemente pode tornar-se endógeno (HERRUZO, 2004). Em vista da sua capacidade para sobreviver em fômites (SHERERTZ, 1985) e na superfície de pacientes (trato gastrointestinal, pele, feridas, queimaduras, faringe, etc), torna-se facilmente compreensível essa sua rápida tendência para disseminação entre pacientes e suas complicações em epidemias nas UTIs (AGNIHOTRI, 2004). Uma vez ocorrendo epidemias causadas por esse microorganismo, sua erradicação é muito difícil (SHERERTZ e SULLIVAN, 1985).

Recentemente *Acinetobacter baumannii* substituiu *Klebsiella pneumoniae* como segundo patógeno mais comum causador de infecção em pacientes queimados (AGNIHOTRI, 2004). Isso se deve, principalmente, à sua habilidade em permanecer viável em ambiente hospitalar, graças ao seu status de microorganismo multiresistente e a vários outros fatores (AGNIHOTRI, 2004; VINDENES, 1995). A alta incidência de septicemia por esse microorganismo pode ter sido ligada ao uso de antimicrobianos de amplo espectro, os quais podem estar alterando mais ainda os padrões de susceptibilidade dos patógenos nosocomiais (BANG, 2002). Possíveis formas de transmissão poderiam ser as mãos ou alguns fômites contaminados (WANG, 2003), tal como o estetoscópio. Herruzo-Cabrera et al. (1996) demonstraram experimentalmente que *Acinetobacter baumannii* pode sobreviver pelo menos um dia no estetoscópio, se a desinfecção normal (álcool 1 minuto) fracassar. Como as medidas de controle mostram eficiência limitada, muito esforço deve ser feito para evitar a introdução dessa bactéria em uma unidade de queimados. Como restrição de pacientes colonizados nas UTIs e unidades de queimados estão os procedimentos de desinfecção e anti-sepsia dos fômites e do pessoal das unidades de saúde (HERRUZO, 2004).

2.6.2.4. Outros patógenos associados com infecção em pacientes queimados

A queimadura tende a ser infectada por bactérias gram-negativas de origem entérica, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter*

gergoviae, responsáveis por infecção de origem endógena. Ziegler et al. (1988) demonstraram que há uma relação entre infecção no paciente queimando com anormalidade na função da barreira do intestino. Contudo, não está claro se é o aumento da permeabilidade intestinal que causa a infecção ou se é a infecção que causa o rompimento na barreira intestinal. Adicionalmente esse paciente, via de regra, recebe antimicrobianos sistêmicos, e essas drogas facilitam o crescimento bacteriano excessivo no intestino, afetando a estrutura e a função da mucosa intestinal (ZIEGLER, 1988).

Os microrganismos gram-negativos oportunistas são a principal causa de bacteremia e do aumento de mortalidade em pacientes queimados (MCMANUS, 1994). Estão ainda muito envolvidos em septicemia, como demonstrado no estudo de Macedo et al., em 2005, no qual *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella pneumoniae* foram causas de sepse em 12,1% e 8,6% dos pacientes, respectivamente. Cepas de *Proteus mirabilis* têm sido, também, encontradas como agentes de infecção invasiva em queimados. A base da toxicidade é desconhecida, porém existem várias possibilidades. Uma delas é que produtos metabólicos do metabolismo da uréia dessa bactéria podem ser tóxicos. Uma segunda possibilidade é que a toxicidade pode ser o resultado da resposta do hospedeiro para um outro produto da bactéria, tal como enzima proteolítica ou lipopolissacáride. Sendo, a infecção invasiva simultânea à toxicidade (MCMANUS, 1982). Alguns estudos, no entanto, não revelaram incidência dessa espécie, ou mostraram uma taxa de isolamento muito baixa, não excedendo 1% (NASSER, 2003 ; VINDENES, 1995).

Outro gram-negativo envolvido em infecção da ferida por queimadura e em bacteremia é *Stenotrophomonas maltophilia* (DALAMAGA, 2003). Apesar de essa bactéria ser encontrada normalmente no solo, em plantas e em ambientes aquosos, é também menos comumente isolada de humanos, e tem-se tornado problemática em ambientes hospitalares. A *S. maltophilia* é uma bactéria aeróbica, não fermentador, móvel, oxidase negativa, catalase positiva e mesofílica (com crescimento ótimo em temperatura entre 30-37^o C). Constitui um significativo patógeno nosocomial, especialmente em pacientes imunocomprometidos e tratados com terapia

antimicrobiana de amplo espectro, como é o caso dos queimados (GILLIGAN, 2003). Esses pacientes mostram fatores clássicos de predisposição para a evolução dessas infecções. Adicionalmente, a ventilação mecânica e o cateterismo representam procedimentos que predispoem à infecção por essa bactéria.

Colonização por *Candida* spp no paciente queimado vem aumentando progressivamente (SONG, 2001), em decorrência da preferência seletiva pelo uso sistêmico ou tópico de antibacterianos. A maioria das infecções ocorre em pacientes com grandes lesões, como demonstrado por Tredget et al., em 2004, e são normalmente causadas por *Candida* spp, colonizando a queimadura trinta dias após o acidente. Apesar de ser rara a invasão do tecido viável por *Candida* spp, a mortalidade por esse fungo na infecção invasiva é maior que 90% (VINDENES, 1995).

Bactérias anaeróbicas têm tido uma representação entre 11% a 31% do número total de microrganismos isolados em áreas de queimaduras (BOWLER, 2001). Infecções por esse tipo de bactéria, como *Clostridium perfringens* e *Clostridium tetani*, são pouco freqüentes, porém podem ocorrer em queimaduras elétricas profundas. Nesses casos, a prevenção de gangrena gasosa através de debridamento cirúrgico deve ser feita assim que possível. O tétano, no queimado, deve ser prevenido com imunização (FERNANDES, 2004). Os vírus são também microrganismos que vêm aumentando sua importância em pacientes queimados. Em alguns casos de infecções por vírus do tipo *Herpes simplex* e *Citomegalovirus* (CMV), a origem pode se endógena ou infecção primária, e a maioria apresenta infecção inaparente (ELSAYED, 2003).

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. CASUÍSTICA E AMOSTRAS

Foram incluídos no estudo 70 pacientes com suspeita clínica de infecção na ferida por queimadura, apresentando mínimo de 20% de superfície corporal queimada (SCQ) de II e III graus, ou com 10% ou mais de áreas de III grau. Foram coletadas 70 amostras de tecido (biópsias) e de *swabs*, de pacientes admitidos no Serviço de Queimados (Centro de Referência – Alta Complexidade) do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba - Curitiba-PR (HUEC). Esses encontravam-se entre o sétimo e o nono dia de internação, que correspondia ao mesmo período após a queimadura. Sendo portanto, incluído no estudo apenas pacientes que foram internados no mesmo dia em que ocorreu o acidente, no período de agosto de 2004 a setembro de 2005, totalizando 70 pacientes.

Foi obtido o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), assinado pelo paciente e/ou pelo responsável legal, anteriormente à coleta (ANEXO I). Caso o paciente fosse incapaz de ler e/ou de fornecer consentimento por escrito, esse era assinado por uma testemunha. Os pacientes incluídos no estudo foram devidamente esclarecidos sobre os objetivos e procedimentos, assim como sobre os efeitos esperados, possíveis benefícios, desvantagens, e sobre quaisquer riscos em potencial.

O presente trabalho foi submetido aos comitês de ética do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba (HUEC) e do Hospital de Clínicas da UFPR (HC-UFPR) e aprovado por eles (ANEXO II).

Uma ficha com dados clínicos e laboratoriais do paciente foi preenchida após a coleta e utilizada como parâmetro para análise do quadro clínico (ANEXO III).

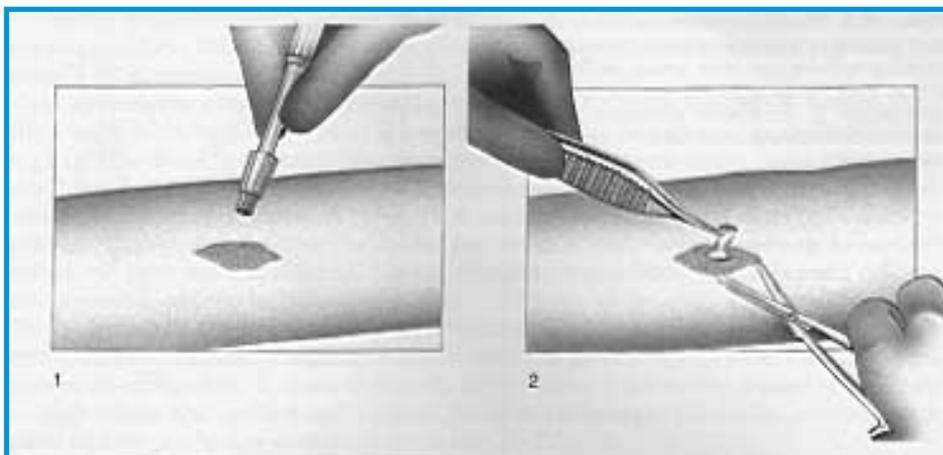
As coletas foram realizadas no centro cirúrgico de queimados (CCQ), onde os pacientes eram admitidos dentro da rotina do serviço de troca de curativos, não havendo mudanças no procedimento anestésico (anestesia geral). Foi realizada limpeza das áreas queimadas escolhidas para a retirada de dois fragmentos, com uso de cloreto de sódio (NaCl) a 0,85%. Foram escolhidas áreas da escara necrótica que se apresentavam com aspecto, coloração e cheiro compatíveis com processo infeccioso

e/ou crescimento bacteriano (PECK, 1998), conforme a experiência clínica dos profissionais diretamente envolvidos no tratamento clínico e cirúrgico dos pacientes. Esses pacientes não estavam fazendo uso de antimicrobianos tópicos e sistêmicos até o momento em que foi realizada a coleta.

Para a retirada dos fragmentos de pele queimada foi introduzida a lâmina do *punch* de 4mm de diâmetro (FIGURA 6), instrumento formado por uma lâmina circular na extremidade de um tubo, que permite a remoção de um cilindro constituído por epiderme, derme e pequena porção de hipoderme, logo abaixo da escara, perpendicularmente à pele. Após atingir a marca limite de corte em profundidade, obtida com a rotação do *punch*, a amostra de tecido era incisada com o uso de uma tesoura curva ou bisturi e o auxílio de uma pinça anatômica (FIGURA 7). Em geral não houve necessidade de sutura, porém coube ao cirurgião avaliar tal condição, no ato da intervenção.

FIGURA 6 - *PUNCH* DE 4 MM UTILIZADO PARA RETIRADA DA BIÓPSIA



FIGURA 7 - ESQUEMA DA COLETA DE BIÓPSIA COM *PUNCH*

O primeiro fragmento removido foi colocado em um frasco estéril contendo 2 ml de cloreto de sódio a 0,85 % e encaminhado ao laboratório para análise microbiológica (FIGURA 8). Na chegada do material ao laboratório foi registrada a sua entrada no sistema informatizado do HUEC. O segundo fragmento, destinado a histopatologia, foi colocado em solução fixadora de formalina (formol a 10%) e encaminhado ao departamento de Patologia Médica, para posterior processamento.

FIGURA 8 - FRAGMENTO DE PELE QUEIMADA EM FRASCO COM NaCl



3.2. MÉTODOS

3.2.1. Cultura Semiquantitativa de Shulman

O fragmento de pele foi pesado em uma balança de precisão e homogeneizado com 2ml de diluente em um triturador de tecidos de 15 ml. Foram então pipetados 0,1 e 0,01 ml (10 μ l e 100 μ l) de suspensão da amostra e inoculados em placas de ágar sangue (AS) e ágar MacConkey (MC), em duplicata (BUCHAMAN,1986). As placas foram incubadas a 35 \pm 2^o C, por 24 a 48 horas (KONEMAN, 2001).

As contagens exatas de colônias foram obtidas das placas de AS e MC, que continham entre 15 a 300 UFC. Quando havia mais que 300 UFC em ambas as diluições, o fator 300 era utilizado como **N** nos cálculos, e o resultado considerado como maior que o valor obtido, com um sinal de maior (>). O número de UFC por grama de tecido foi dado pela fórmula:

$$\frac{\mathbf{N \times V \times v}}{\mathbf{W}}$$

onde:

N = número de UFC contados na placa;

V = volume de inóculo utilizado (0,1 ou 0,01 ml);

v = volume de diluente utilizado no homogeneizado (2ml);

W = peso do tecido.

Sendo considerado com ponto de corte para infecção contagens > 10⁵ UFC/ g de tecido.

3.2.2. Análise Histopatológica

Uma vez fixada, a amostra (formol 10%) foi desidratada automaticamente, passando por soluções de concentração crescente de álcoois e posteriormente diafanizada em xilol, sendo então incluída em parafina, o que permitiu a realização de cortes de 6 μm em micrótomo, com navalhas descartáveis. Os cortes foram desparafinados, e posteriormente corados pelas colorações de HE (Hematoxina-eosina) e Gram modificado - Brown-Brenn (QUADRO 2).

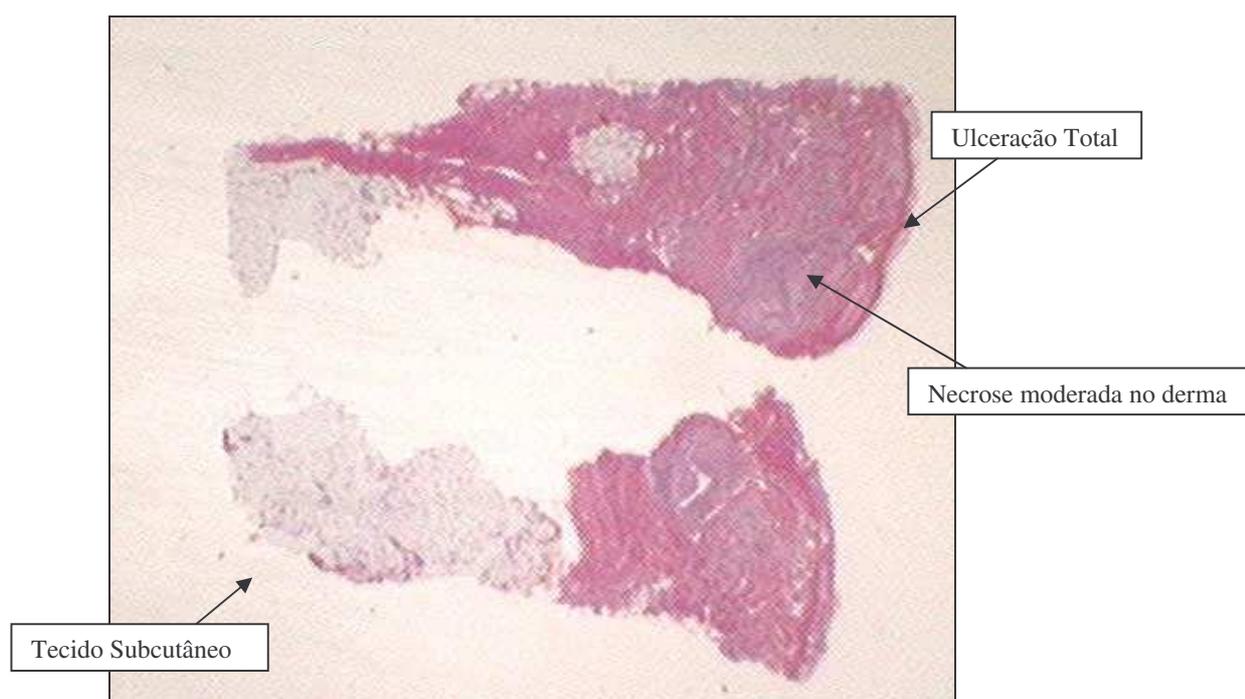
QUADRO 2 - TÉCNICAS DE PREPARO DO FRAGMENTO DE BIÓPSIA PARA ESTUDO HISTOLÓGICO

<ul style="list-style-type: none"> × Fragmento fixado em formalina (formol 10%) × Desidratação com álcool 70, 80, 90 e 100% × Clareamento com xilol × Inclusão em parafina, na estufa, 56-60° C × Confeção do bloco do bloco × Microtomia: cortes de 5-6μm, perpendiculares à superfície cutânea × Cortes estendidos na estufa a 70-80° C e colocados na lâmina × Fixação do material na lâmina em estufa a 70-80° C × Desparafinização com xilol puro × Hidratação com álcool absoluto, 90, 80 70% e água × Colorações de HE e Gram × Montagem da lamínula com Bálsamo do Canadá sobre a lâmina × Exame ao microscópio óptico

Os cortes histológicos foram inicialmente examinados pelo HE em microscópio óptico (aumento de 100 e 400 vezes), o que permitiu, nos cortes com *punch*, a distinção dos vários planos do tecido (epiderme, derme e subcutâneo) (FIGURA 9), a verificação da presença ou ausência de necrose e inflamação, e a detecção de estruturas fúngicas.

Além disso, levantou a possibilidade de infecção bacteriana. Assim, as amostras foram julgadas totalmente ulceradas quando apresentaram epiderme ausente ou parcialmente ulcerada, ou epiderme com parcial reepitelização. A necrose foi dita discreta quando atingia apenas a derme superficial; moderada, com derme intermediária; e severa quando atingia a derme profunda. Quando não especificada era necrose coagulativa, e se especificada, era supurativa. Já a resposta inflamatória crônica, que esteve sempre relacionada à resposta vascular/reativa, foi classificada como discreta, moderada e acentuada.

FIGURA 9 - VISÃO PANORÂMICA DO CORTE DE PELE QUEIMADA COM O USO DE *PUNCH* (HE 4x)



A coloração de Gram-modificado (ANEXO IV) possibilitou detectar a presença de bactérias no tecido e assegurar a profundidade alcançada por elas (FIGURA 10). Foram analisadas em microscópio óptico, com aumento de 40 e 100 vezes, correlacionado

topograficamente com o HE, e de 400 e 1.000 vezes para a visualização e a caracterização dos microrganismos. As bactérias presentes foram julgadas, quanto à quantidade, em pequena quantidade (unifocal) e grande quantidade (multifocal). Quanto à localização, as bactérias foram pesquisadas em todas as camadas do *punch* e também verificadas quanto à disposição em tecido viável ou em tecido necrótico (necrose coagulativa ou supurativa). Se em tecido viável, era classificada como infecção invasiva da ferida por queimadura; caso contrário, não era considerada como infecção.

As análises de todas as amostras foram realizadas pela mestranda e por um patologista experiente envolvido no estudo. O tempo médio para a leitura de cada lâmina foi de 10 minutos.

FIGURA 10 - CORTE HISTOLÓGICO DE PELE QUEIMADA CORADO PELO GRAM-MODIFICADO – VISUALIZAÇÃO DE BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS (GRAM 400x)



3.2.3. Identificação das Espécies Bacterianas

Após crescimento significativo (acima de 15 UFC) nas placas de meio de cultura, os microrganismos isolados foram identificados utilizando-se protocolos microbiológicos convencionais, baseados em características morfológicas e bioquímicas das bactérias, rotineiramente utilizados no Setor de Microbiologia do HUEC.

Posteriormente, as amostras bacterianas foram suspensas em solução de criopreservação e armazenadas a - 80° C para realização de testes complementares de confirmação das identificações, os quais foram realizados na Seção de Bacteriologia do Serviço de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da UFPR. Os microrganismos foram preparados, para o congelamento por inoculação, em placas de ágar sangue e incubação até a fase estacionária de crescimento. As colônias desenvolvidas na superfície do ágar foram recolhidas com alça esterilizada e transferidas diretamente para um criotubo com caldo infuso de cérebro e coração (BHI), adicionado de 15% de glicerol e emulsionadas até uma suspensão final densa (REIMER, 2003).

3.2.3.1. Identificação de *Pseudomonas aeruginosa*

Para a confirmação da identificação de *Pseudomonas aeruginosa* foram analisadas as características das colônias crescidas no ágar MacConkey, que se apresentavam como lactose-negativas, redondas, lisas e com odor adocicado característico (KISKA, 2003). Foram submetidas à prova da oxidase e, em caso positivo, a confirmação da espécie em questão foi realizada por meio das provas representadas no QUADRO 3.

QUADRO 3 - TESTES DE IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DAS AMOSTRAS DE *Pseudomonas aeruginosa* ISOLADAS

TESTE	<i>P. aeruginosa</i>
OF glicose	+
Motilidade	+
Pioverdina (Pseudo F)	+ 65
Piocianina (Pseudo P)	+ *
Crescimento a 42°C	+ 100 *
Acetamida	+ 100 *
Redução de nitrato	+ 98
Gás nitrogênio	+ 93
Hidrólise da gelatina	V 82
Cetrimide 30°C	+ 96
OF xilose	+ 90

FONTE: KISKA e GILLIGAN 2003

NOTAS: + 90% das amostras positivas; V 11-89% das amostras positivas. * Provas que diferenciam a espécie.

3.2.3.2. Identificação de *Staphylococcus aureus*

Para a identificação de *Staphylococcus aureus*, as colônias suspeitas nas placas de ágar sangue foram submetidas às provas da catalase, da coagulase livre (em lâmina) e da coagulase ligada (em tubo). Mediante positividade dessas provas, foram realizados testes confirmatórios para a identificação definitiva, como: hemólise em ágar sangue de carneiro, fermentação do manitol (em ágar contendo açúcar e vermelho de fenol), crescimento em meio de Chapman contendo 7,5% de cloreto de sódio (CHAPMAN, 1945) e atividade da desoxirribonuclease em ágar DNase. Foram utilizadas as técnicas preconizadas na 8ª edição do Manual de Microbiologia Clínica da Sociedade Americana de Microbiologia (BANNERMAN, 2003).

Foram também realizados, para os *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente (MRSA), testes de triagem com placas de oxacilina contendo 4% de NaCl e 6 µg/ml de oxacilina e com placas de vancomicina contendo 4% de NaCl e 4 µg/ml de vancomicina, para detecção do gene *mecA* e VISA/VRSA, respectivamente.

3.2.3.3. Identificação de *Acinetobacter baumannii*

Para a identificação dos isolados de *Acinetobacter baumannii* as colônias suspeitas no ágar MC foram submetidas às provas iniciais de identificação, como: oxidase, fermentação da glicose e motilidade (SCHRECKENBERGER, 2003). Para diferenciar as várias espécies desse gênero do *Acinetobacter baumannii* foi realizada uma série de testes (QUADRO 4).

QUADRO 4 - TESTES DE IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DAS AMOSTRAS DE *Acinetobacter baumannii* ISOLADAS

TESTE	<i>A. baumannii</i>
Oxidase	-
Catalase	+
Glicose	V ⁺
Motilidade	-
Redução de nitrato (NO ₃ – NO ₂)	-
Crescimento 44 °C	G *
Hemólise em AS	-
Citrato	+
Hidrólise de esculina	-
Liquefação da gelatina	-
Malonato	V ⁺
Arginina dehidrolase	V ⁺
Lisina descarboxilase	-
Ornitina descarboxilase	V ⁺
Fenilalanina desaminase	V

FONTE: MACFADDIN, 2000

NOTAS: V: reação variável; V⁺ variável geralmente positivo; G: crescimento. * Prova que diferencia a espécie.

3.2.3.4. Identificação das enterobactérias

Os isolados foram submetidos a uma bateria de testes bioquímicos para confirmação da identificação das espécies bacterianas. Foram realizadas provas principais de identificação, como: glicose; gás; indol; vermelho de metila (VM); Voges

Proskauer (VP); citrato; sulfeto de hidrogênio (H₂S); uréia; L-tryptofano desaminase (LTD); arginina; ornitina; lisina e motilidade (ABBOTT, 2003).

3.2.4. Teste de Suscetibilidade:

Foi realizado o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos pelo método clássico de disco-difusão em ágar de Kirby-Bauer, recomendado pela Sociedade Americana de Microbiologia (ASM), das bactérias isoladas (JORGENSEN, 2003).

Para amostras de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* foram testados os seguintes antimicrobianos: amicacina, aztreonam, ampicilina/sulbactam, cefepime, ceftazidima, ciprofloxacino, gentamicina, imipenem, piperacilina/tazobactam, polimixina, tobramicina e meropenem. Ao mesmo tempo as amostras de *Staphylococcus aureus* foram testadas frente aos seguintes antimicrobianos: amoxicilina/ácido clavulânico, cefalotina, clindamicina, eritromicina, gentamicina, linezolida, oxacilina, sulfametoxazol/trimetoprim, teicoplanina e vancomicina. E para as demais bactérias gram-negativas fermentadoras foram testados os seguintes antimicrobianos: amicacina, ampicilina, ampicilina/sulbactam, cefepime, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, ciprofloxacino, ertapenem, gentamicina, imipenem, piperacilina/tazobactam e sulfametoxazol/trimetoprim (CLSI/NCCLS, 2003 – M2-A8).

Os resultados das culturas foram reportados aos médicos responsáveis, com o número exato de UFC/g de tecido e o correspondente teste de suscetibilidade.

Posteriormente, foi realizado o teste de suscetibilidade por concentração inibitória mínima (CIM) de todas as amostras de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Acinetobacter baumannii* armazenadas, pelo método de diluição em ágar, frente a diferentes concentrações de antimicrobianos.

3.2.4.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) por Microdiluição em Ágar

A Concentração Inibitória Mínima – CIM é a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microrganismo, em testes de sensibilidade por diluição em ágar. A CIM obtida usando-se o teste de diluição pode mostrar ao médico qual a concentração do agente antimicrobiano necessária no sítio da infecção, para inibir o organismo infectante. A CIM, entretanto, não representa um valor *absoluto*. A “verdadeira” CIM está num ponto entre a menor concentração do teste que inibe o crescimento do organismo (ou seja, a leitura da CIM) e a próxima menor concentração do teste.

O teste de concentração inibitória mínima por diluição em ágar foi realizado segundo padronização do CLSI/NCCLS 2003 (M7-A6), para verificar a sensibilidade das cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Staphylococcus aureus* frente a diferentes antimicrobianos (TABELA 1).

TABELA 1 - SOLUÇÕES-ESTOQUE DE ANTIMICROBIANOS TESTADOS PARA CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Staphylococcus aureus*

ANTIMICROBIANO <i>P. aeruginosa</i> e <i>A. baumannii</i>	SOLUÇÃO ESTOQUE ($\mu\text{g/ml}$)	ANTIMICROBIANO <i>S. aureus</i>	SOLUÇÃO ESTOQUE ($\mu\text{g/ml}$)
Amicacina	25600	Amicacina	25600
Aztreonam	12800	Cefoxitina	6400
Ampicilina/Sulbactam	12800/6400	Ciprofloxacino	800
Cefepime	12800	Gentamicina	6400
Ceftazidima	12800	Linezolid	800
Ciprofloxacino	1600	Oxacilina	100
Gentamicina	6400	Teicoplanina	6400
Imipenem	6400	Vancomicina	800
Piperacilina/Tazobactam	51200/4		
Polimixina	800		
Meropenem	6400		

Agentes Antimicrobianos

Os sais-antimicrobianos apresentam o nome genérico da droga no rótulo, bem como sua potência (expressa, em geral, em microgramas [μg] ou Unidades Internacionais [UI] por mg de pó). O valor da potência fornecido pelo fabricante deverá incluir consideração das medidas de pureza. A potência poderá ser expressa como percentual, ou em unidades de $\mu\text{g}/\text{mg}$.

A equação a seguir foi utilizada para determinar a quantidade de pó, ou diluente, necessária para a solução estoque:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volume (mL)} \times \text{Concentração } (\mu\text{g/mL}) (1)}{\text{Potência } (\mu\text{g}/\text{mg})}$$

Assim, a concentração da solução estoque foi determinada de acordo com a maior diluição a ser testada e a quantidade de ágar Muller-Hinton (MHA). Sendo utilizadas placas grades (150 x 15 mm), com 50 ml de MHA, suficientes para obter 3-4 mm de espessura de meio padronizados.

Apesar da contaminação microbiana ser extremamente rara, as soluções foram esterilizadas por meio de uma membrana-filtro. As soluções foram então alicotadas, mantidas a temperatura de - 80 ° C e os frascos retirados apenas no dia de seu uso.

Número de Concentrações Testadas

Foram testadas duas concentrações acima do ponto de corte fornecido pela literatura (CLSI/NCCLS, 2005) até uma faixa em que os organismos do controle de qualidade tivessem valores dentro da escala (TABELA 2)(TABELA 3). As diluições foram feitas a partir da solução estoque com água estéril tipo Milli Q.

TABELA 2 - PONTOS DE CORTE PARA *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* SEGUNDO CLSI/NCCLS E CONCENTRAÇÕES DOS ANTIMICROBIANOS TESTADOS

ANTIMICROBIANOS	PONTOS DE CORTE (µg/mL)		CONCENTRAÇÕES TESTADAS (µg/mL)
	S	R	
Amicacina	≤ 16	≥ 64	0,5 – 512
Aztreonam	≤ 8	≥ 32	0,06 – 256
Ampicilina/Sulbactam	≤ 8/4	≥ 32/16	2/1 – 256/128
Cefepime	≤ 8	≥ 32	0,015 – 256
Ceftazidima	≤ 8	≥ 32	0,06 – 256
Ciprofloxacino	≤ 1	≥ 4	0,004 – 32
Gentamicina	≤ 4	≥ 16	0,25 – 128
Imipenem	≤ 4	≥ 16	0,06 – 128
Piperacilina/Tazobactam	⁽¹⁾ ≤ 64/4 ⁽²⁾ ≤ 16/4	⁽¹⁾ ≥ 128/4 ⁽²⁾ ≥ 128/4	¼ - 1024/4
Polimixina	≤ 2	≥ 4	0,125 – 8
Meropenem	≤ 4	≥ 16	0,008 – 128

NOTAS: (1) Para *Pseudomonas aeruginosa* e (2) Para *Acinetobacter baumannii*

TABELA 3 - PONTOS DE CORTE PARA *Staphylococcus aureus*, SEGUNDO CLSI/NCCLS, E CONCENTRAÇÕES TESTADAS

ANTIMICROBIANOS	PONTOS DE CORTE (µg/mL)		CONCENTRAÇÕES TESTADAS (µg/mL)
	S	R	
Amicacina	≤16	≥32	1 – 128
Cefoxitina	≤8	≥32	1 – 128
Ciprofloxacino	≤1	≥4	0,12 – 16
Gentamicina	≤4	≥8	0,12 – 32
Linezolid	≤4	-	1 – 16
Oxacilina	≤ 2	≥ 4	0,12 – 2
Teicoplanina	≤8	≥32	0,25 – 128
Vancomicina	≤4	-	0,5 – 16

Preparo do Meio Ágar Mueller-Hinton e do inóculo

O ágar MHA foi preparado a partir de uma base desidratada, seguindo as instruções do fabricante, acertando-se o pH para 7,2-7,4. O volume distribuído foi de 49 ml para todos os antimicrobianos. Após autoclavado (121°C/ 15 min), o ágar foi esfriado em banho-maria a 45-50°C, antes de serem acrescentadas, assepticamente, as diluições apropriadas de solução antimicrobiana aos meios derretidos. Foram colocados, posteriormente, nas placas de Petri estéreis.

As placas foram então armazenadas a temperaturas de 2 a 8°C e utilizadas 24 horas após o preparo, certificando-se de que a superfície estivesse seca antes da inoculação. Aquelas que apresentavam umidade no meio foram colocadas na câmara de fluxo laminar durante 30 minutos e semi-destampadas, para a secagem.

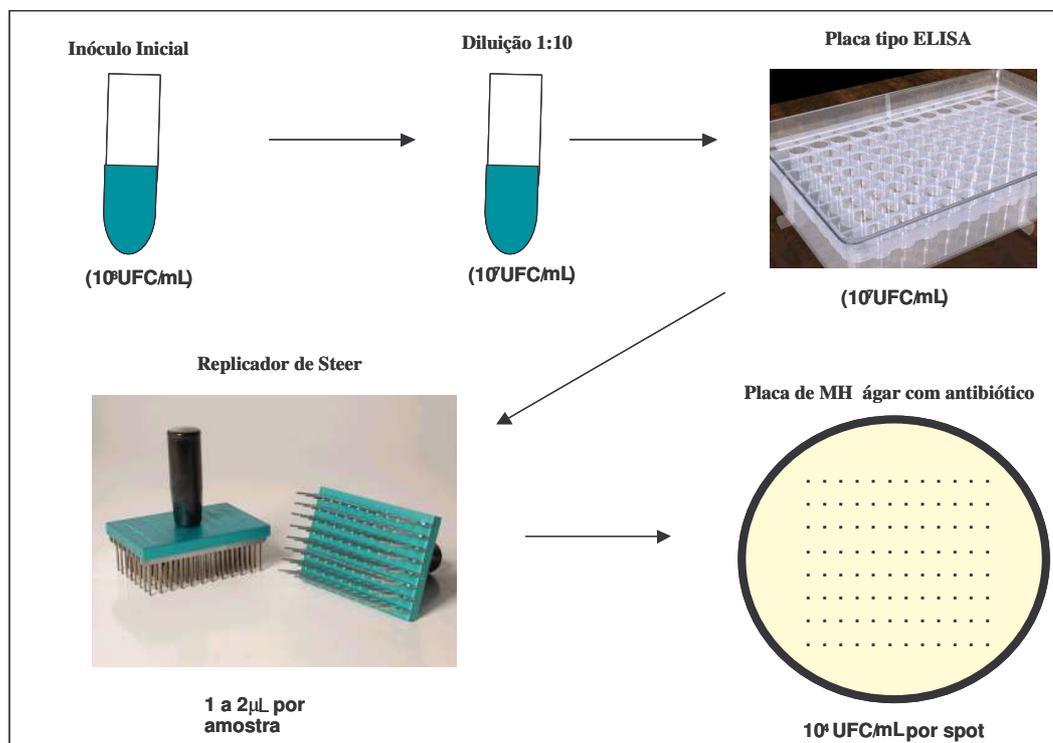
O inóculo foi preparado ajustando-o ao padrão McFarland 0,5, que contém aproximadamente 10⁸ UFC/ml. Por ser necessária uma concentração final do inóculo de 10⁴ UFC/ml para “spot” de 5-8 mm, essa suspensão foi diluída 1:10, a fim de se obter a concentração de 10⁷ UFC/mL, pois foi utilizado o multiinoculador (ou replicador) de

Steer com 96 pinos, que dispensa de 1 a 2 μL , obtendo-se, portanto, a concentração final desejada.

Esse inóculo diluído foi distribuído em alíquotas de aproximadamente 100 μL na placa de ELISA de 96 poços, sendo então possível a aplicação rápida e simultânea dos inóculos na superfície do ágar. Inoculou-se primeiramente em uma placa controle (sem agente antimicrobiano), e a seguir iniciou-se pela placa de menor concentração, passando por todas as diferentes concentrações do antimicrobiano (FIGURA 11). Por fim, foi inoculado em uma segunda placa de controle do crescimento, para verificar se houve contaminação ou transferência significativa de antimicrobiano durante a inoculação.

As placas foram mantidas à temperatura ambiente até a secagem dos pontos, sendo importante se lembrar de que esse tempo não pode ultrapassar trinta minutos. Em seguida foram invertidas e incubadas a 35°C por 16-20 horas.

FIGURA 11 - ESQUEMA SIMPLIFICADO DO MÉTODO DE DILUIÇÃO EM ÁGAR



Determinação da CIM e controle de qualidade

A leitura das placas foi realizada em uma superfície escura, não refletiva, e assim foram determinados os pontos finais. A CIM foi registrada como a menor concentração do agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento, descartando-se qualquer colônia única ou turvação leve.

Os valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ foram definidos como a concentração inibitória mínima para inibir o crescimento bacteriano de 50% e 90% das amostras, respectivamente (CLSI/NCCLS, 2005).

Conforme recomendado pelo CLSI/NCCLS, foram testadas as seguintes cepas padrões: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213 e *Escherichia coli* ATCC® 25922, cujos resultados foram compatíveis para os antimicrobianos testados (CLSI/NCCLS, 2005) (TABELA 4).

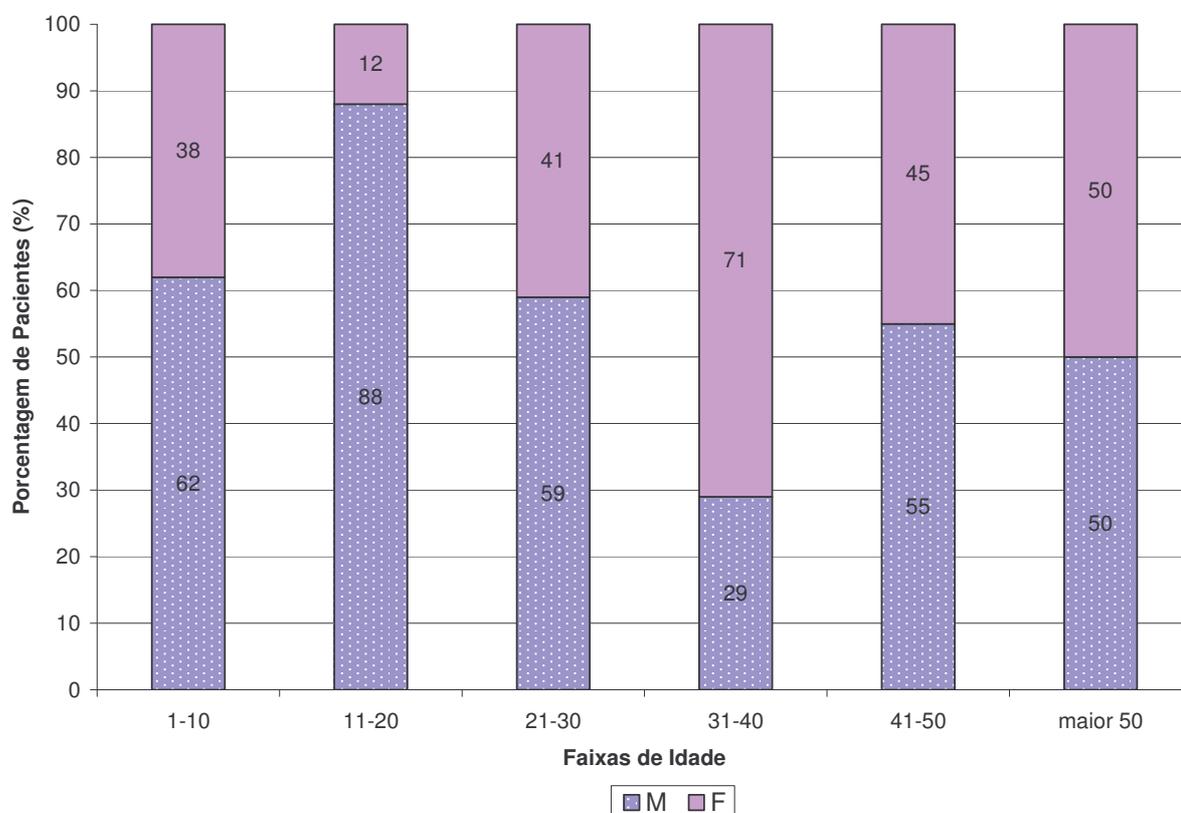
TABELA 4 - LIMITES ACEITÁVEIS PARA AS CEPAS CONTROLES, SEGUNDO CLSI/NCCLS 2005

ANTIMICROBIANOS <i>P. aeruginosa</i> e <i>A. baumannii</i>	<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853 (µg /ml)	<i>E. coli</i> ATCC® 25922 (µg /ml)	ANTIMICROBIANOS <i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> ATCC® 29213 (µg /ml)
Amicacina	1 – 4	0,5 – 4	Amicacina	1 – 4
Aztreonam	2 – 8	0,06 – 0,25	Cefoxitina	1 – 4
Ampicilina/Sulbactam	0,25 – 1	0,004 – 0,015	Ciprofloxacino	0,12 - 0,5
Cefepime	1 – 4	0,06 – 0,5	Gentamicina	0,12 – 1
Ceftazidima	1 – 8	0,015 – 0,12	Linezolid	1 – 4
Ciprofloxacino	0,5 – 2	0,25 - 1	Oxacilina	0,12 - 0,5
Gentamicina	1 – 4	0,06 – 0,25	Teicoplanina	0,25 – 1
Imipenem	0,25 – 1	0,008 – 0,06	Vancomicina	0,5 – 2
Piperacilina/Tazobactam	¼ - 8/4	¼ - 4/4		
Polimixina	0,25 – 2	0,25 - 2		
Meropenem	8/152 – 32/608	< 0,5/9,5		

4. RESULTADOS

Foi coletado um total de 70 biópsias e culturas de superfícies (*swabs*), de 70 pacientes, durante o período do estudo. Desses 70 pacientes, 41 (59%) eram homens e 29 (41%) mulheres. A predominância de homens foi observada em quase todas as faixas de idade, com exceção da faixa entre 31 e 40 anos, cuja relação foi de 2,5M:1H, conforme representado no GRÁFICO 1. A predominância masculina foi mais marcante nos pacientes entre 11 e 20 anos (mantendo uma relação de 7H:1M). Acima dos 50 anos essa relação foi de 1H: 1M. A média de idade foi de 25,1 anos, variando de 1 a 77 anos. As crianças na faixa de 1 a 10 anos de idade perfizeram um total de 30% do total de pacientes.

GRÁFICO 1 - DISTRIBUIÇÃO DOS 70 PACIENTES DE ACORDO COM A IDADE E SEXO



Houve uma predominância de queimaduras por líquidos inflamáveis, na frequência de 46% (32 pacientes). O álcool foi o líquido envolvido na maioria dos casos. Enquanto 26% (18 pacientes) sofreram queimaduras por escaldadura tendo como principal causador água fervente, 19% (13 pacientes) sofreram queimaduras por chama, 4% (3 pacientes) queimaduras por abrasão e eletricidade e apenas 1% queimadura química por ácido sulfúrico (GRÁFICO 2). As várias causas de lesão termal em relação à idade estão presentes no GRÁFICO 3.

GRÁFICO 2 - ETIOLOGIA DAS QUEIMADURAS E PROBABILIDADE ACUMULADA

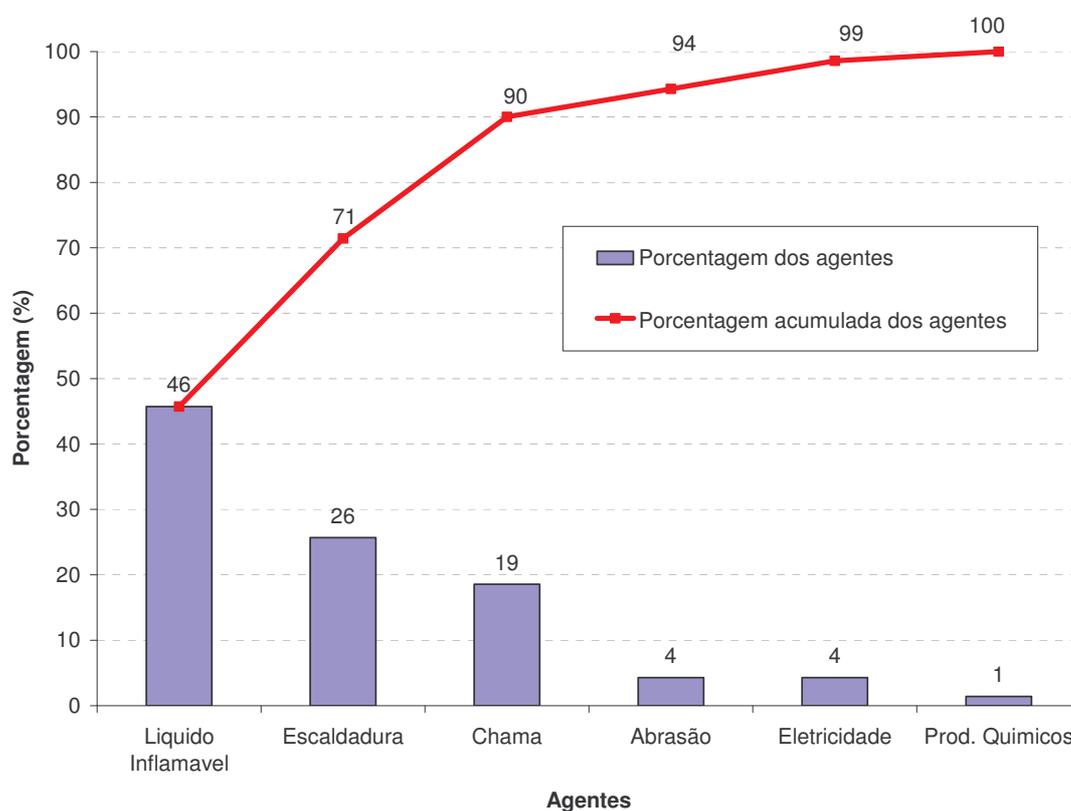
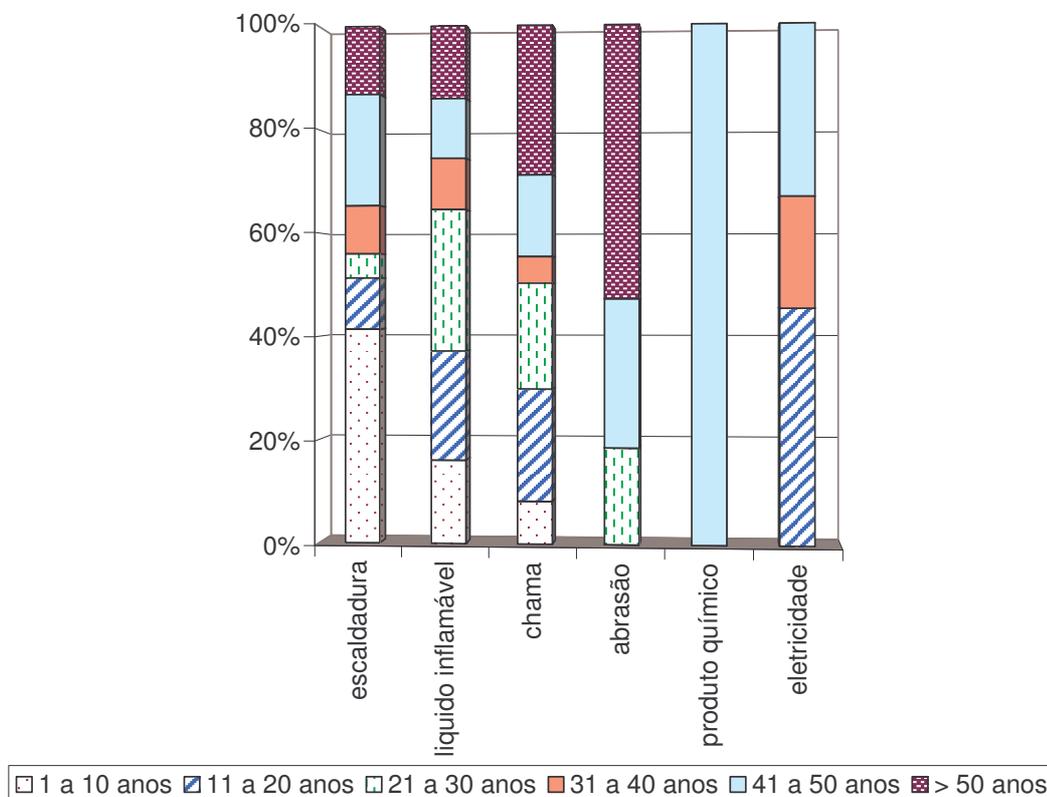


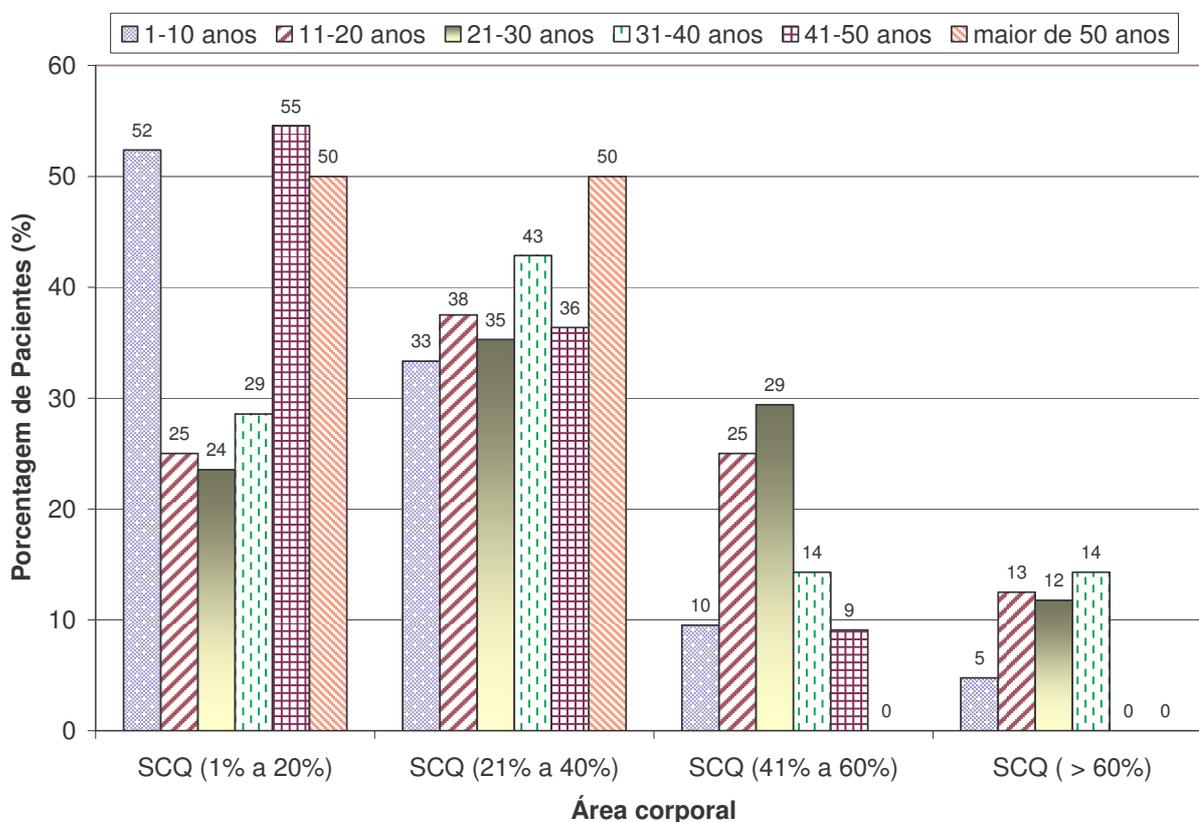
GRÁFICO 3 - DISTRIBUIÇÃO DOS AGENTES DAS QUEIMADURAS EM RELAÇÃO À IDADE



A média do tamanho da queimadura foi de 32% de Superfície Corporal Queimada (SCQ), entretanto o desvio padrão foi elevado em 17,5, ou seja, houve uma variação muito grande, de 10 a 80% de SCQ. O GRÁFICO 4 mostra a distribuição da extensão da queimadura para os 70 casos, por faixa de idade. Em média as crianças e os idosos demonstraram maior prevalência nas menores faixas de SCQ (entre 1% a 20%). Enquanto foram encontrados pacientes de todas as faixas etárias com SCQ entre 1% a 40%, entretanto não foi encontrado nenhum paciente acima de 41 anos de idade com SCQ > 60%, e nenhum paciente acima de 50 anos com SCQ entre 41% a 60%. O número de pacientes envolvidos em queimaduras de mais que 60% de SCQ foi o mais baixo (5 pacientes), já que pacientes com grandes porcentagens de superfície corporal queimadas correm um maior risco de não sobreviverem aos danos iniciais da

queimadura. A maioria (40%, 28 pacientes) das queimaduras envolve 20% ou menos de SCQ; (37%, 26 pacientes) de 21-40 SCQ, (16%, 11 pacientes) de 41-60% e (7%, 5 pacientes) mais de 60% de SCQ. Para os pacientes do estudo a média do tempo de hospitalização foi de 30 dias (variando entre 23-360 dias).

GRÁFICO 4 - DISTRIBUIÇÃO DAS FAIXAS ETÁRIAS EM RELAÇÃO A SUPERFÍCIE CORPORAL QUEIMADA (SCQ)



A área afetada mais comum foi a dos membros, de maneira isolada, em 13 pacientes (19%), ou associada a outras áreas, em 47 pacientes (67%). O tronco foi comprometido de forma isolada em 7 pacientes (10%) e associados a outras áreas em 47 pacientes (67%) dos casos, enquanto a cabeça não foi comprometida de maneira

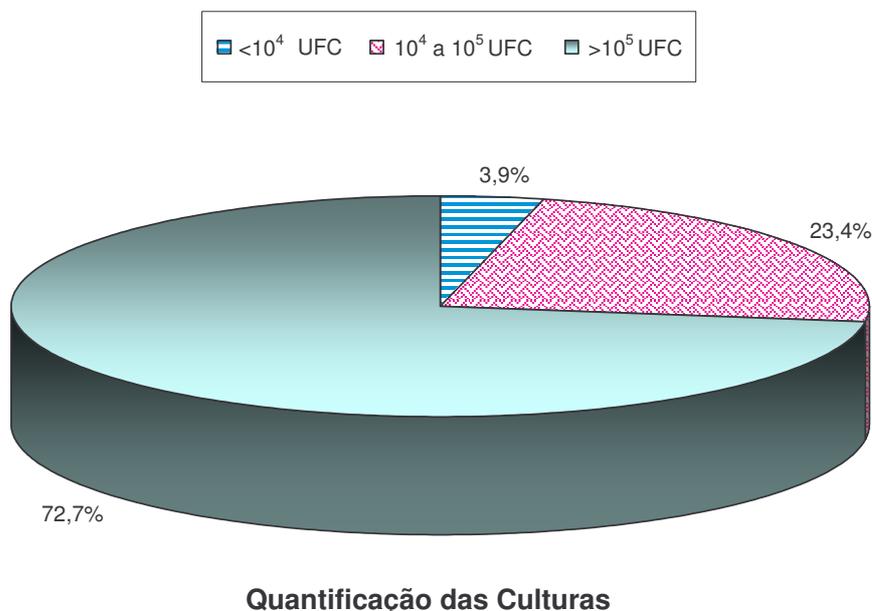
isolada em nenhum caso, mas associada a outras áreas, em 27 pacientes (39%). Em 21 pacientes (30%) parte de todas as regiões do corpo foram afetadas.

A média do peso das 70 biópsias coletadas e encaminhadas para a realização da técnica de cultura semiquantitativa foi de 1,2 g, variando entre 0,01 g a 0,15 g. Nessas 70 biópsias estudadas 57 tiveram cultura positiva (81% do total), com contagens do número total de colônias por gram de tecido na faixa de 30 a 300 UFC por esse método. Dezesesseis desses pacientes com biópsia positiva (28%) desenvolveram subseqüentemente sinais clínicos de sepse, e 6 (11%) foram a óbito.

Das 57 amostras de tecido positivas para o desenvolvimento de microrganismos, um total de 3 culturas teve menos que 10^4 UFC/ g de tecido, enquanto 56 culturas tiveram contagens maiores que 10^5 UFC/ g de tecido. As culturas que se encontravam na faixa entre 10^4 e 10^5 UFC/ g de tecido perfizeram um total de 18. Suas porcentagem estão representadas no GRÁFICO 5.

A média das contagens de bactérias na biópsias foi $10,2 \times 10^5$ microrganismos / g de tecido (variando, 10^3 - $>10^6$).

GRÁFICO 5 - PORCENTAGEM DA QUANTIFICAÇÃO DE 57 BIÓPSIAS POSITIVAS



Pacientes em que apenas um microrganismo foi isolado, esse processo foi designado como monocultura; 65% dos pacientes estavam enquadrados nesse grupo, enquanto 35% tiveram dois microrganismos infectando suas feridas. *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* ou *Staphylococcus aureus* e *Acinetobacter baumannii* eram as combinações mais usuais. Nos resultados da cultura de biópsia não houve desenvolvimento de três ou mais microrganismos simultâneos infectando a queimadura.

A análise do total de bactérias contadas na biópsia mostrou que o patógeno mais comum foi *Pseudomonas aeruginosa* (44%), seguido por *Acinetobacter baumannii* (31%) e *Staphylococcus aureus* (13%), incluindo cepas oxacilina sensível (MSSA), oxacilina resistente (MRSA), e outras (12%). Nessas outras se incluem *Klebsiella*

pneumoniae, *Enterobacter gergoviae*, *Serratia marcescens* e *Staphylococcus epidermidis*. O GRÁFICO 6 mostra a freqüência e a probabilidade acumulada das espécies bacterianas encontradas durante o estudo. Enquanto o GRÁFICO 7 representa a análise das bactérias isoladas em associação com o agente da queimadura, demonstrando a presença de *P. aeruginosa* em lesões termiais causadas pelos mais variados tipos de agentes e a presença da maioria dos microrganismos nas queimaduras por escaldadura.

GRÁFICO 6 - FREQUÊNCIA E PORCENTAGEM ACUMULADA DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS DE 70 BIÓPSIAS

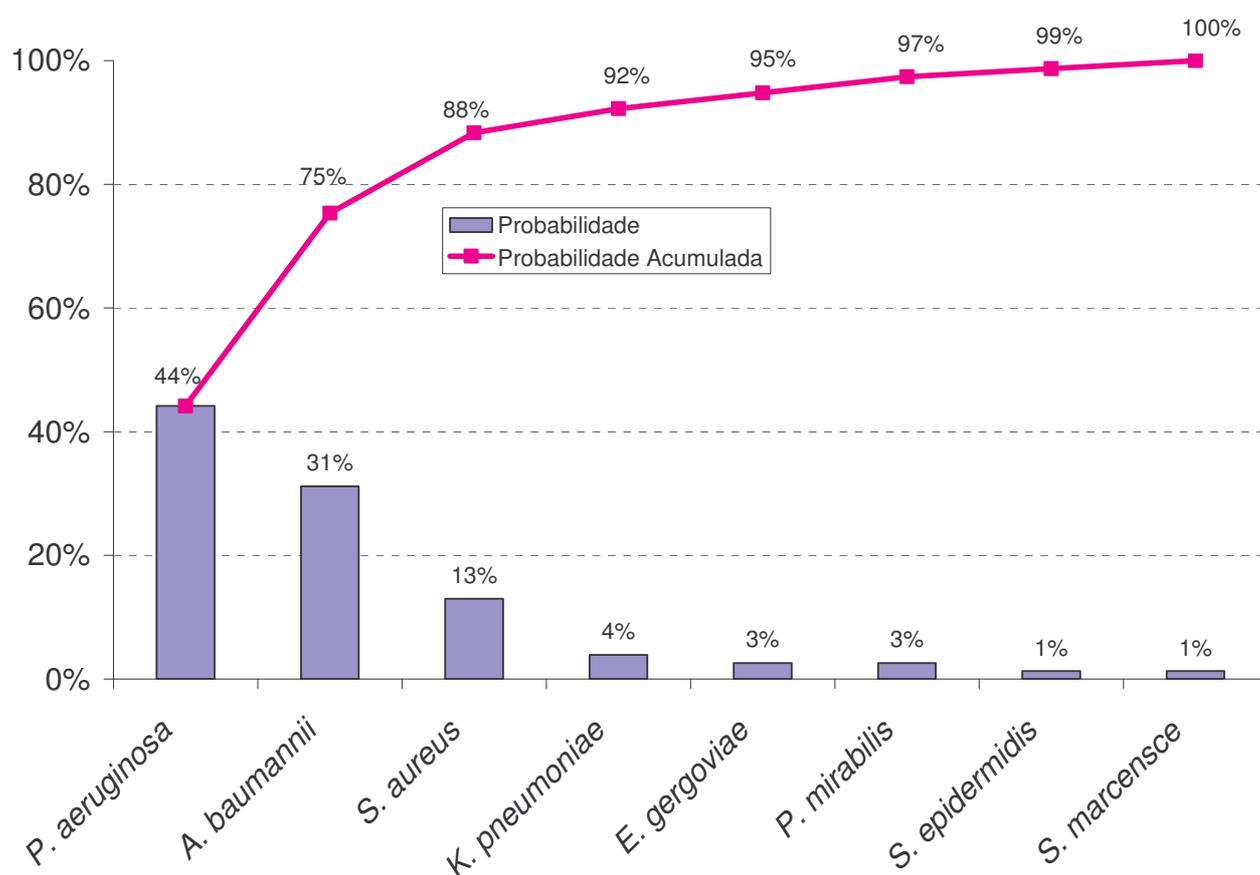
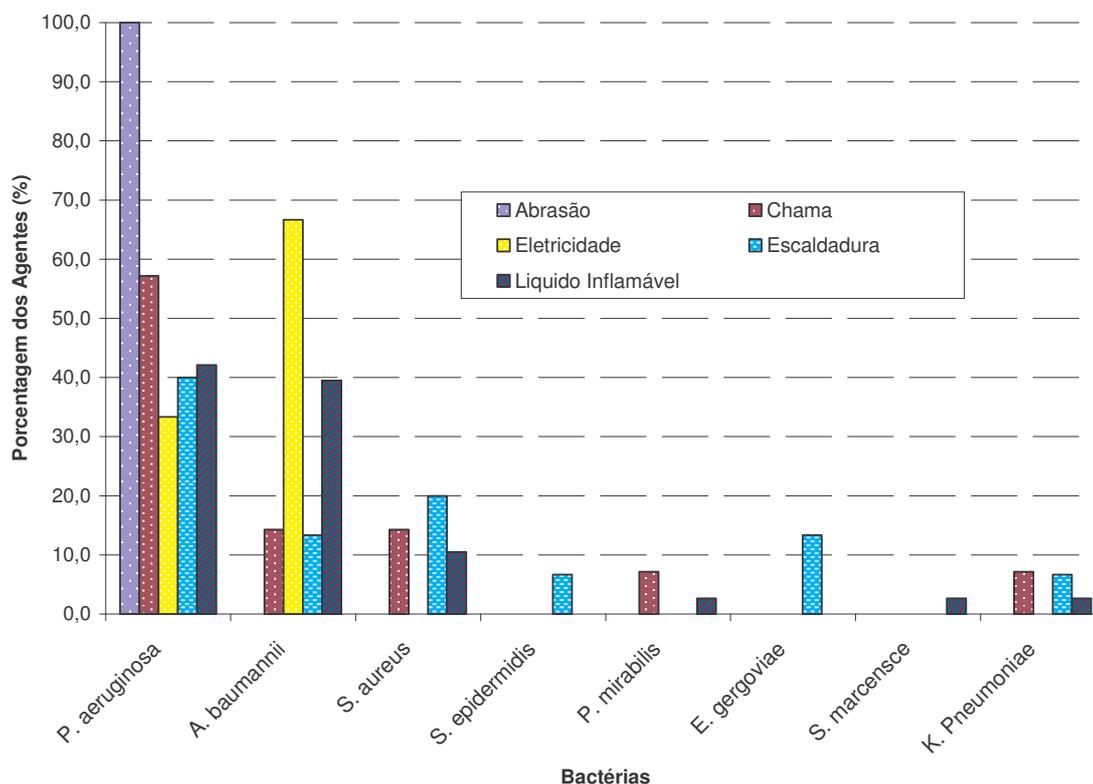


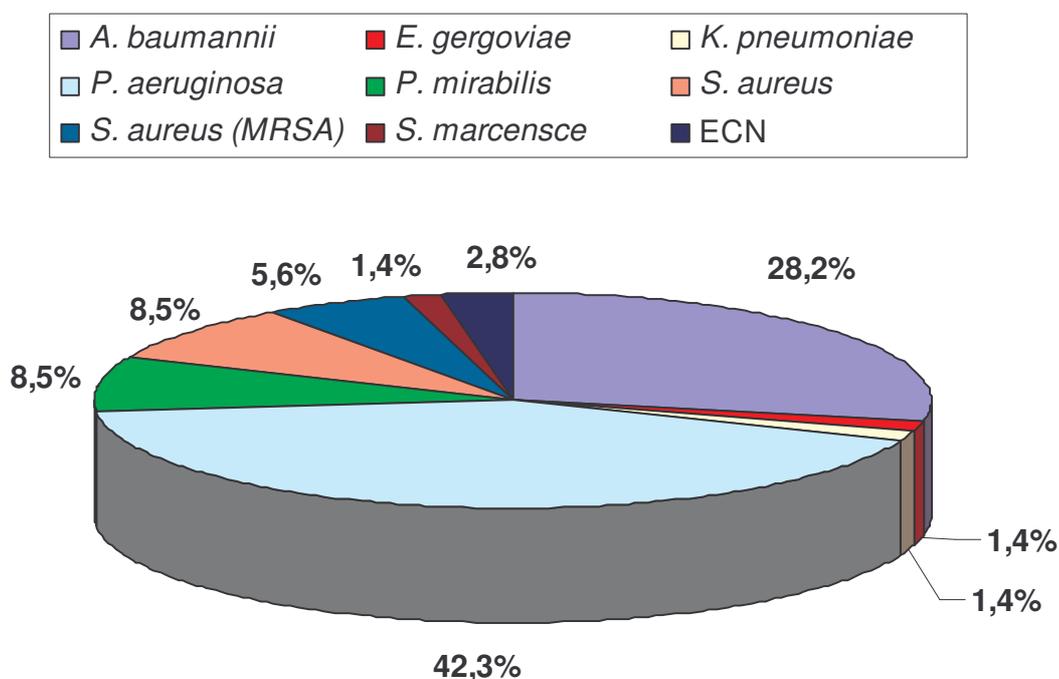
GRÁFICO 7 - REPRESENTAÇÃO DAS BACTÉRIAS ISOLADAS POR AGENTE ETIOLÓGICO DA QUEIMADURA



Os resultados de 70 culturas de superfície (*swabs*) puderam ser comparados com culturas de biópsia, pois foram coletadas na mesma ocasião. Os resultados foram idênticos em 36% dos casos, o que representou a amostra onde não houve crescimento bacteriano ou houve crescimento idêntico. Resultado totalmente diferente, ou seja, diferentes espécies de bactérias ou crescimento em apenas uma das amostras foi encontrado em 31% das culturas. Nos demais 33%, os resultados foram parcialmente iguais, ou seja, pelo menos uma espécie bacteriana era igual em ambas às amostras.

Foi registrado crescimento bacteriano em 93% das culturas de superfície (*swabs*). Dentre os patógenos identificados *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* foram os mais comuns (GRÁFICO 8). Múltiplos isolados foram encontrados em 24 casos (34%), isolados únicos em 24 casos (34%) e duplos em 17 casos (24%) de amostras de *swabs*.

GRÁFICO 8 - FREQUÊNCIA DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS DE 70 AMOSTRAS DE CULTURA DE SUPERFÍCIE POR SWAB



Os resultados da análise histopatológica demonstraram que a grande maioria das amostras, no período em que foi realizada a coleta, era ulcerada (ausência total de epiderme) (84%), enquanto apenas 14% dessas apresentavam a epiderme com parcial reepitelização. Com relação à necrose 50% das amostras apresentaram necrose

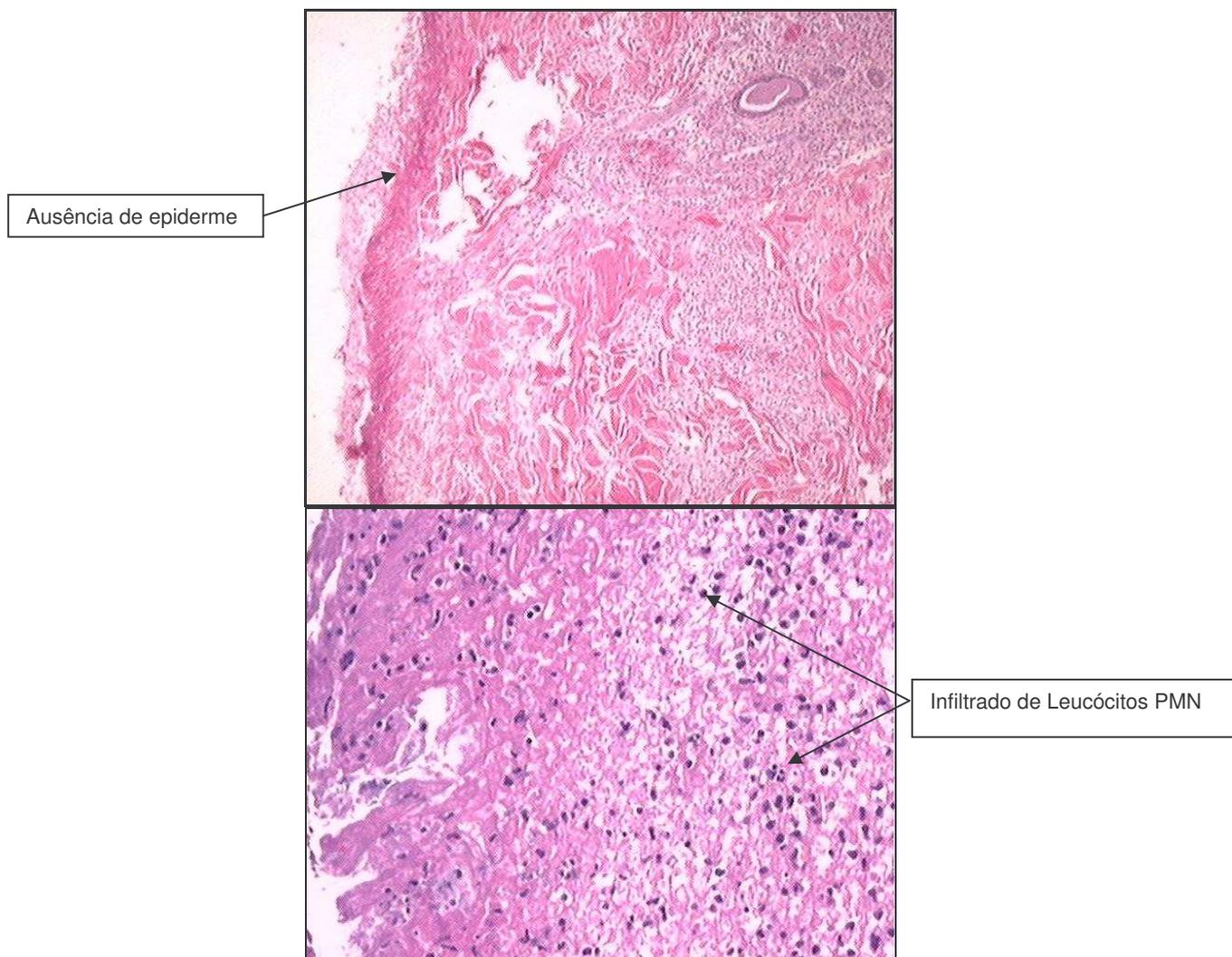
moderada, atingindo até a derme intermediária e com exudação de neutrófilos, 24% necrose discreta atingindo apenas a derme superficial e os demais 11% apresentaram necrose severa atingindo até a camada de derme profunda. A inflamação linfoplasmocitária e o edema na derme e no subcutâneo eram do tipo crônica/reparadora discreta (FIGURA 12). Das 70 amostras de pele queimada processadas, 28 (40%) foram positivas para o encontro de bactérias. Dessas positivas, a identificação de bactérias gram-negativas ocorreu em 21 (75%) amostras, achado que concordou com os resultados da cultura em 75% dos casos. A

FIGURA 13 representa o encontro dos tipos de bactérias nas biópsias pela coloração de Gram. Com relação à infecção, 21 amostras (72%) positivas na análise histológica foram compatíveis com infecção invasiva da ferida por queimadura, pelo encontro de bactérias localizadas em tecido viável (TABELA 5), sendo que 81% dos casos de infecção ocorreram por bacilos gram-negativos, 19% devido a cocos gram-positivos, e não houve relato de identificação de fungo no estudo.

TABELA 5 - RESULTADOS DE ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS

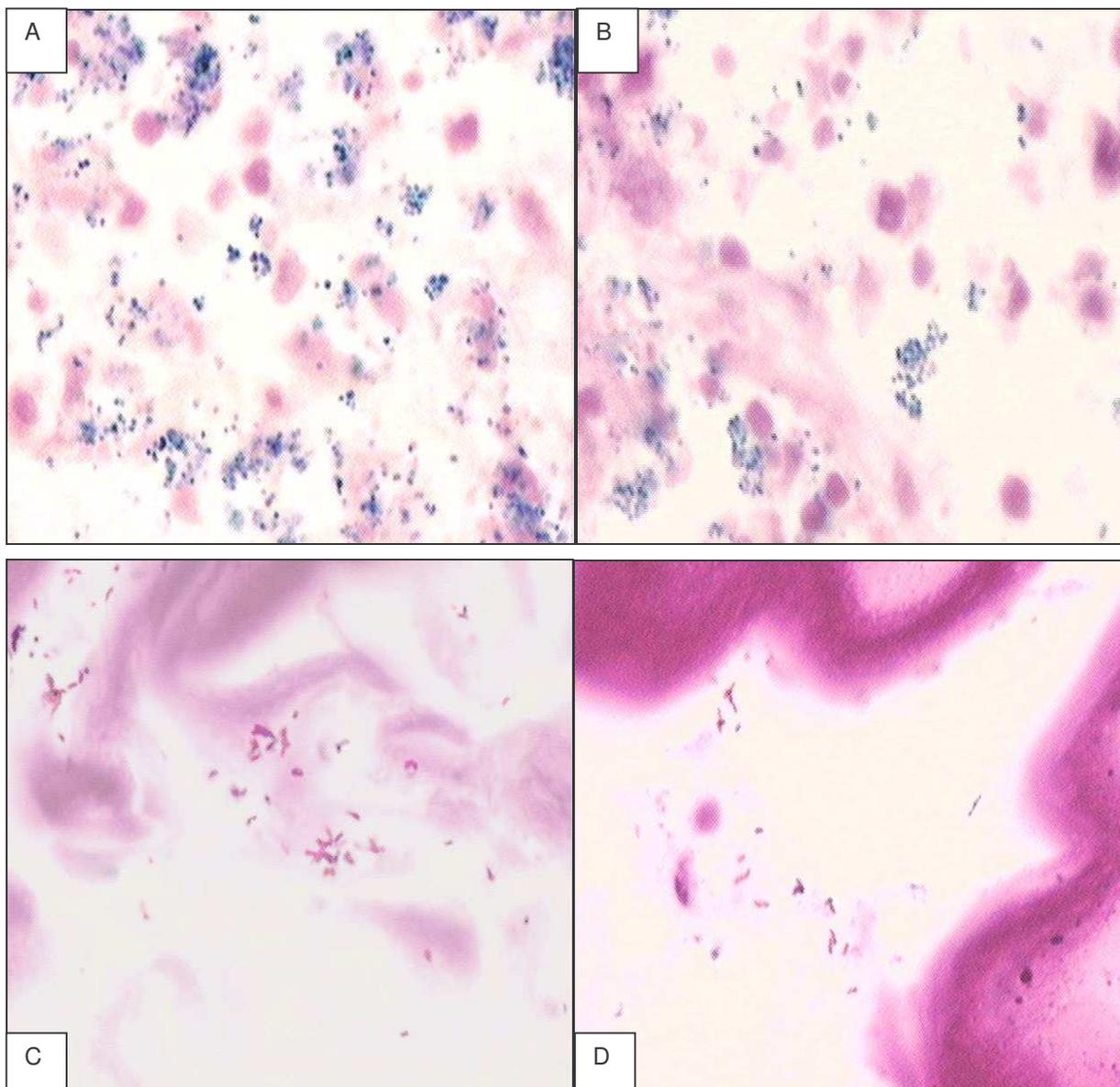
	PRESENÇA DE BACTÉRIAS	INFECÇÃO (invasão de tec, viável)	% INFECÇÃO
SIM	28	21	72
NÃO	41	7	28
TOTAL GERAL	70	21	100

FIGURA 12 - ULCERAÇÃO TOTAL DA EPIDERME, NECROSE SUPURATIVA E INFLAMAÇÃO MODERADAS NA DERME (HE 40x E 200x)



LEGENDA: PMN leucócitos polimorfonucleares.

FIGURA 13 - AGRUPAMENTOS DE BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS DISPOSTAS NA DERME SUPERFICIAL (GRAM 1000x) (A, B). BACILOS GRAM-NEGATIVOS NA DERME SUPERFICIAL DISPOSTOS ENTRE FIBRAS COLÁGENAS (C) E NA LUZ DO FOLICULO PILOSO (D)

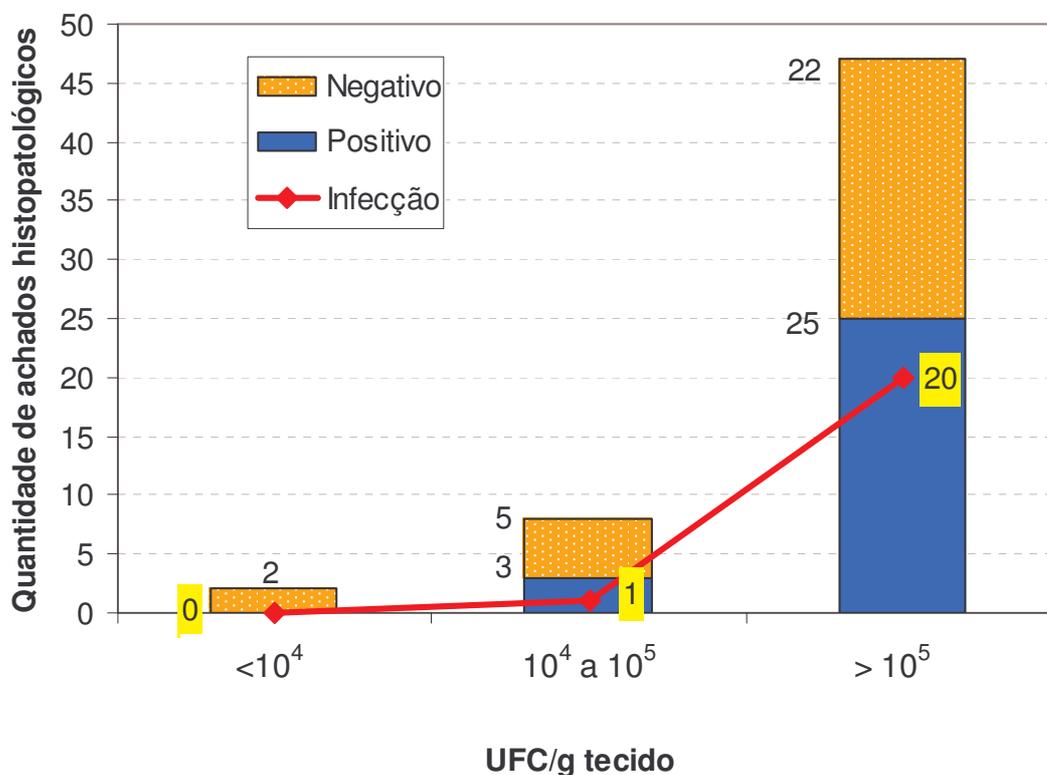


Como dito anteriormente, foram utilizados níveis de contagens de bactérias maiores que 10^5 UFC/g de tecido para designar as biópsias por grupos de culturas positivas e negativas. Estas duas populações foram então examinadas para a frequência de achados histológicos positivos e negativos. A principal concordância foi feita entre achados histológicos negativos concordando com culturas negativas, ocorrendo em 100% dos casos e entre achados histológicos negativos concordando com crescimento menor ou igual a 10^5 UFC/g em 90% das vezes. Enquanto que, em apenas 53% (25 amostras) das 47 culturas com crescimento superior a 10^5 UFC/g de tecido foi positiva para o encontro de bactérias pela análise histopatológica. Dessas 25 amostras houve um diagnóstico histológico de infecção invasiva em apenas 43% (20 amostras) dos casos. A análise desses dados de quantificação das culturas em relação aos achados positivos, negativo e de infecção pela análise histológica estão representados no GRÁFICO 9. Já a TABELA 6 demonstra os valores de positividade e de infecção das duas técnicas de diagnóstico.

TABELA 6 - RESULTADOS DA POSITIVIDADE E ACHADOS DE INFECÇÃO DAS DUAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO POR BIÓPSIA

BIÓPSIA	Nº		%	
	AMOSTRAS POSITIVAS	AMOSTRAS INFECÇÃO		
CULTURA	57/70	47/57	81%	82%
HISTOPATOLÓGICO	28/70	21/28	40%	72%

GRÁFICO 9 - ANÁLISE DOS ACHADOS HISTOLÓGICOS EM COMPARAÇÃO COM OS RESULTADOS DE QUANTIFICAÇÃO DA CULTURA



Diferentes antimicrobianos foram testados contra microrganismos gram-negativos e gram-positivos, pelo método de diluição em ágar para a determinação da CIM. Quando a susceptibilidade aos antimicrobianos para 34 amostras de *Pseudomonas aeruginosa* foi analisada, demonstrou que a polimixina B foi o antibiótico de maior potência (100% de sensibilidade), com valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ abaixo dos pontos de corte para sensibilidade, seguido pelo imipenem e piperacilina/tazobactam (78% e 73% de sensibilidade). Dentre os cabapenêmicos, o imipenem apresentou sensibilidade ligeiramente superior (78%) ao meropenem (65%). Outros antimicrobianos que também apresentaram elevada potência foram meropenem, ceftazidima e ciprofloxacino. Os demais antimicrobianos testados apresentaram valores de CIM₅₀ acima dos pontos de corte para sensibilidade e de CIM₉₀ acima do ponto de corte para

resistência, sendo gentamicina o antibiótico que apresentou resultado menos satisfatório (40% de sensibilidade).

Para as 24 amostras de *Acinetobacter baumannii* a melhor sensibilidade foi obtida com polimixina (100% de sensibilidade), imipenem e meropenem (ambos 75% de sensibilidade). A potência dos antimicrobianos foi baixa, sendo que apenas polimixina e piperacilina/tazobactam apresentaram valores de CIM₅₀ abaixo dos pontos de corte para sensibilidade. Todos os antimicrobianos, com exceção da polimixina, apresentaram CIM₉₀ acima do ponto de corte para resistência e aztreonam foi o de menor sensibilidade (5%).

A potencia (CIM₅₀), atividade (CIM₉₀) e sensibilidade (%) dos antimicrobianos testados para *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* estão demonstrados na TABELA 7.

TABELA 7 - SENSIBILIDADE DAS AMOSTRAS DE *P. aeruginosa* E *A. baumannii* E VALORES DE CIM₅₀ E CIM₉₀

ANTIMICROBIANOS	CIM (µg/mL) <i>P. aeruginosa</i>		% SENSIBILIDADE	CIM (µg/mL) <i>A. baumannii</i>		% SENSIBILIDADE
	CIM ₅₀	CIM ₉₀		CIM ₅₀	CIM ₉₀	
Amicacina	32	> 512	48	128	256	20
Aztreonam	16	64	48	64	128	5
Ampicilina/Sulbactam	-	-	-	16/8	64/32	20
Cefepime	16	64	45	128	> 256	5
Ceftazidima	4	256	70	128	> 256	5
Ciprofloxacino	0,5	32	23	> 32	> 32	15
Gentamicina	8	> 128	40	16	> 128	25
Imipenem	2	32	78	1	64	75
Piperacilina/Tazobactam	64/4	256/4	73	64/4	256/4	15
Polimixina	1	2	100	0,5	0,5	100
Meropenem	1	32	65	2	64	75

NOTAS: CIM 50 : mínima concentração capaz de inibir 50% dos isolados; CIM 90 : mínima concentração capaz de inibir 90% das amostras.

(1) Para *Pseudomonas aeruginosa* (2) Para *Acinetobacter baumannii*

A determinação das CIM dos antimicrobianos testados frente às amostras de *Staphylococcus aureus* está representada na TABELA 8. Os antimicrobianos com melhor potência e atividade foram linezolid, teicoplanina e vancomicina com CIM₅₀ e CIM₉₀ abaixo dos pontos de corte para sensibilidade, enquanto os outros antimicrobianos testados apresentaram valores acima do ponto de corte para resistência. Analisando-se as sensibilidades, linezolid, teicoplanina e vancomicina foram os antimicrobianos com maior número de cepas sensíveis (100%), seguidos por amicacina (42%), geantamicina (40%) e oxacilina (29%).

Os resultados de resistência à oxacilina demonstraram que *S. aureus* – MRSA representou 67% do total de *S. aureus* isolados, dado esse que confirmou os encontrados pelo método de disco difusão.

TABELA 8 - SENSIBILIDADE DAS AMOSTRAS DE *Staphylococcus aureus* E VALORES DE CIM₅₀ E CIM₉₀

ANTIMICROBIANOS	CIM (µg/mL)		% SENSIBILIDADE
	CIM ₅₀	CIM ₉₀	
Amicacina	128	>128	42
Ciprofloxacino	16	>16	17
Gentamicina	1	>32	40
Linezolid	2	2	100
Oxacilina	>2	>2	33
Teicoplanina	1	2	100
Vancomicina	1	1	100

NOTAS: CIM 50 : mínima concentração capaz de inibir 50% dos isolados; CIM 90 : mínima concentração capaz de inibir 90% das amostras.

5. DISCUSSÃO

As queimaduras são feridas traumáticas, causadas por agentes térmicos, químicos, elétricos ou radioativos, que atuam nos tecidos de revestimento do corpo humano e, diferem dos outros tipos de feridas em muitos aspectos. Vários são os fatores que influenciam o prognóstico e determina a maior ou a menor gravidade de uma queimadura. Dentre esses podemos citar o agente causal, a doença de base, a idade do paciente, a extensão da queimadura, o tipo e a quantidade de microrganismo na ferida por queimadura e até mesmo traumas associados à queimadura (TREDGET, 2004).

A distribuição dos pacientes por faixa de idade demonstrou predominância da proporção de crianças (30%); FONTANA et al. (1994) encontraram porcentagens parecidas em seu estudo (32,4%). Esse é um dado relevante, pois em um estudo prévio foi mostrado que crianças com idade inferior a 2,5 anos e adultos com idade superior a 65 tem maior risco de mortalidade após a lesão, aumentam o período de hospitalização e a estadia nas UTIs. Sendo que, o maior risco relativo de mortalidade foi demonstrado com a combinação idade e infecção nosocomial (ONCUL, 2002).

Em relação ao sexo, verificou-se que 59% dos pacientes pertenciam ao sexo masculino e 41% ao sexo feminino como verificado por vários autores (ALEGHEHBANDAN, 2002; FONTANA, 1994; LEMOS, 2003). A predominância mais marcante do sexo masculino na faixa de 11 a 20 anos também foi observada por Leonardi et al. (2002), o sexo feminino prevaleceu somente na faixa entre 31 e 40 anos. A idade e o sexo dos pacientes que foram a óbitos não diferiram dos sobreviventes, contudo a mortalidade foi mais significativa nos homens (86%) quando comparado a 14% nas mulheres, o contrário dos achados de Taneja et al. (2004)

Etiologicamente, as queimaduras por líquidos inflamáveis apresentaram maior prevalência (46%), sendo o álcool o principal agente seguido pela escaldadura e pela chama. Em contraste com outros estudos de prevalência em que a chama aparece como o agente mais freqüente, responsável pelas lesões (BANG, 2002; HERUZO, 2004; MABROUK, 2003). Esse agente prevaleceu em todas as faixas de idade, com exceção

das crianças entre 1 a 10 anos que se queimaram por escaldadura. Os acidentes por líquidos quentes são os mais freqüentes na infância, fato esse constatado pelas estatísticas da maioria dos centros de tratamento de queimados, nacionais e internacionais (ALAGHEHBANDAN, 2001).

Para os paciente do estudo a média da SCQ (32%) foi mais alta que a de outros estudos prospectivos (APPELGREN, 2002; WURTZ, 1995) porém, em concordância com estudos de Taneja et al. em 2004 com uma média de 34% e 37% de SCQ para homens e mulheres, respectivamente. A SCQ é um dos fatores de risco mais importante em infecção de pacientes queimados, já que ela determina, na maioria dos casos, um aumento na permanência hospitalar. Assim, quanto maior a SCQ do paciente, pior é o seu prognóstico (ONCUL, 2002). No presente estudo as crianças e os idosos (entre 1 a 10 anos e > 50 anos) apresentaram as menores porcentagens de SCQ (entre 1 a 20%) e os adultos (na faixa de 31 a 40 anos) apresentaram as maiores porcentagens de SCQ (> 60%). É portanto fato, que a faixa que compreende entre 31 a 40 anos foi a que obteve o maior número de óbitos, já esses índice nas crianças e idosos foi baixo pelo fato da escaldadura normalmente provocar queimaduras menos extensa e profundas.

Desde a demonstração por Teplitz et al. em 1964, da patogênese da sepse por queimadura pelas progressivas colonizações bacterianas da mesma e subsequente invasão, tentativas têm sido feitas para o desenvolvimento de melhores métodos de monitoramento bacteriológico em feridas por queimaduras. O método de cultura quantitativa de biópsia descrito por Loeb et al (1974a) tem sido reconhecido por vários autores como um indicador útil para o diagnóstico e o tratamento da infecção em pacientes queimados (LAWRENCE, 1992; MCMANUS, 1987; PALLUA, 1999; SJÖBERG, 2003).

No entanto, por envolver o uso de várias diluições esse método tornou-se muito caro e trabalhoso para o laboratório clínico. Com o objetivo de redução substancial de tempo e custo, foi desenvolvida por Shulman et al. em 1979 a técnica de cultura semiquantitativa de biópsia, envolvendo o uso de 10 µl e 100 µl de homogêneo de amostra, plaqueados em ágar sangue e ágar MacConkey, dependendo do peso da amostra. BUCHANAN et al., 1986 por sua vez, compararam a técnica padrão da cultura

quantitativa com a da cultura semiquantitativa, a qual ofereceu reprodutibilidade, eficácia, rapidez e redução de custos.

Em razão disso, este estudo avaliou a técnica da cultura semiquantitativa de biópsia com a possibilidade de instituí-la na rotina de culturas dos pacientes queimados, na unidade em estudo. E esta por se tratar de um método confiável e de fácil execução, mostrou-se útil na avaliação do estado microbiológico dessas feridas. Utilizando como indício de infecção contagens $> 10^5$ UFC/g de tecido.

O uso de biópsia na avaliação quantitativa microbiológica produz informações precisas quanto ao tipo de infecção presente e a carga bacteriana, principalmente de feridas cobertas por tecido necrótico (STEER, 1996a). Por essa razão, sugere-se que a técnica do *swab*, uma das técnicas de cultura de superfície mais utilizada nos centros de queimados, não avalia a medida da densidade bacteriana abaixo da superfície da escara, ou seja, não alcança as regiões profundas do tecido (PALLUA, 1999). Assim essa técnica falha em predizer a presença ou a progressão da colonização para infecção, em razão da pobre correlação entre a microbiota superficial cultivada e a colonização do tecido profundo. Sendo, as bactérias isoladas e identificadas através de técnicas com biópsias, mais relevantes em relação à infecção invasiva da ferida e possível septicemia, que as identificadas por culturas de superfície, podendo representar uma colonização da superfície da ferida (SJÖBERG, 2003). Além disso, os resultados das culturas de superfície são influenciados por fatores como recente hidroterapia e aplicação tópica de agentes antimicrobianos (LOEBL, 1974b).

Avaliando a cultura semiquantitativa de biópsia e a técnica de cultura de superfície por *swab*, observamos uma diferença de 64% nos resultados, ou seja, 31% das culturas apresentaram resultados de diferentes espécies e/ou crescimento em apenas uma das amostras e 33% de diferenças parciais, com pelo menos uma espécie bacteriana equivalente. Levine et al. em 1976 demonstraram uma relação numérica linear entre cultura quantitativa de superfície por *swab* e de biópsia e Bouza et al. (2002) obteve bons resultados usando cultura semiquantitativa de *swab* para contagens de bactérias viáveis na mesma ferida por queimadura, ambos em feridas abertas, ou seja, não cobertas por tecido necrótico.

A lesão termal impede a pele de exercer sua função normal de barreira, permitindo a colonização microbiana das queimaduras. O tipo e a quantidade de microrganismos colonizadores da ferida influenciam a frequência de infecções invasivas, septicemia e morte (NASSER, 2003; ELSAYED, 2003). Assim, o uso da avaliação microbiológica quantitativa facilita a vigilância da ferida por queimadura (MCMANUS, 1987) e o estabelecimento de um diagnóstico presuntivo de infecção invasiva quando bactérias colonizadoras são mais que 10^5 UFC por grama de tecido (BARRET, 2003; MCMANUS, 1987; VOLENEC, 1979).

Estudos de quantificação bacteriana em queimados indicam que biópsias com contagens iguais ou superiores a 10^5 UFC/g de tecido resultaram em sinais de sepse (BHARADWAJ, 1983; VOLENEC, 1995). Outros pesquisadores também demonstraram que não têm sido recomendadas as realizações de enxertos em feridas clínicas, bem como em feridas experimentais que contenham mais que 10^5 UFC/g de tecido (KRIZEK, 1967; ROBSON, 1997). Shulman et al. em 1979, verificou que feridas aparentemente preparadas, na avaliação clínica para o enxerto, mas que tinham contagens $> 10^5$ UFC por grama de tecido, tinham seus enxertos mal sucedidos. Dados experimentais, indicam que o nível crítico de bactérias $> 10^5$ ou mais interferem na pega do enxerto. Apesar de não ter sido avaliada neste estudo a relação entre a contagem de bactérias e perda do enxerto, fica mais uma vez evidenciado o valor crítico de $> 10^5$ UFC/g de tecido como limiar na avaliação microbiológica dessas feridas.

No presente estudo, os resultados de culturas com contagens maiores que 10^5 UFC/g de tecido representou 73% do total de amostras. O que representou uma alta taxa de infecção, podendo esse dado ser explicado pelo tipo de paciente incluído no estudo. Esse era composto de pacientes com suspeita clínica de infecção e entre o sétimo e o nono dia após a queimadura, que é julgado ser o período em que ocorre a maior parte das infecções no serviço. Houve também uma alta porcentagem de culturas com contagens maiores que 10^5 UFC/g de tecido, em pacientes com altas porcentagens de SCQ. Já que tem sido verificado que uma porcentagem maior de superfície corporal queimada aumentaria a carga total de bactérias à qual o paciente estaria submetido (FRESHWATER, 1980). Isso pôde ser demonstrado por Krupp et al.

(1992) que em seus estudos, demonstraram uma correlação entre taxa de morte e a presença de mais de 10^5 bactérias por grama de tecido em pacientes com mais de 60% do total de superfície corporal queimada

Herruzo-Cabrera et al. (1996) mostraram que uma cultura semiquantitativa pode distinguir entre colonização e infecção da ferida, usando limiar de $> 10^5$ UFC/g de tecido. No entanto, considerações devem ser feitas, em relação a outros fatores, tais como a área da superfície corporal queimada, a idade do paciente, a distribuição de altas concentrações e o tipo de microrganismo, já que muitos pacientes queimados, eventualmente, curam-se na presença de um número muito mais alto de bactérias (STEER, 1996b). Na análise do total de bactérias contadas na biópsia não houve significância entre aqueles pacientes julgados clinicamente com infecção e aqueles julgados sem; contudo houve uma mudança na decisão para se realizar um enxerto e mudança ou instituição de antimicrobianos.

Por causa da variedade de ambos, manifestações clínicas locais e sistêmicas da infecção invasiva, grande ênfase é dada em propor uma correta identificação da microbiota da ferida por queimadura (NASSER, 2003). Nessa encontra-se tecido necrótico que é rodeado por tecido edematoso danificado, mantido úmido a 37° C, fornecendo excelentes condições para o crescimento dos microrganismos (LAWRENCE, 1992). Assim, ela é colonizada, pela própria microbiota da pele, 24 horas após a queimadura, e em 4 a 5 dias depois da morte do tecido e formação de exsudatos torna-se fortemente colonizada por bactérias (endógenas ou exógenas), a não ser que medidas efetivas sejam tomadas para mantê-las afastadas (SHARMA, 1981).

No estudo, as culturas de biópsias revelaram que simples isolados foram mais comuns que duplos ou múltiplos isolados, como observado por Kaushik et al. (2001) porém, contrastando com estudos de Revathi et al. (1998). Enquanto que, nas culturas de superfície por *swab* houve uma alta porcentagem de múltiplos isolados por amostras, demonstrando que apesar de ser uma técnica simples e não invasiva, não reflete de fato a verdadeira microbiota presente no tecido profundo. Além disso, o fato da maioria das culturas apresentar-se com múltiplos microrganismos, tornar essa metodologia mais demorada e possivelmente mais cara. Pois, a realização de

sucessivos reisolamentos para a identificação dos microrganismos desenvolvidos atrasa a entrega desse resultado ao médico. Assim, as culturas de amostras de *swabs* podem fornecer informações enganosas ou inúteis em relação ao verdadeiro patógeno causador de infecção.

Houve uma maior prevalência de microrganismos gram-negativos na proporção de 86% dos isolados, como verificado por outros estudos (ARSLAN,1999; ONCUL, 2002). Esta alta prevalência se deve ao fato dos microrganismos gram-negativos com o passar dos tempos colonizarem a queimadura, e pelo fim da primeira semana esses prevalecem (PRUITT, 1998). Essa colonização da queimadura por microrganismos gram-negativos ocorre predominantemente por bactérias endógenas, por causa das mudanças locais e sistêmicas, as quais são agravadas pelo tratamento com antimicrobianos sistêmicos. O sistema gastrointestinal, por exemplo, é colonizado por patógenos, os quais colonizam a ferida por queimadura cinco dias após a lesão (BARRET, 2003).

Dentre os microrganismos gram-negativos *Pseudomonas aeruginosa* foi o de maior prevalência (44%) do total de isolados. Sendo que essa bactéria esteve presente em todas as queimaduras provocadas pelos vários tipos de agentes. Esses achados de alta prevalência são consistentes com vários outros relatos, nos quais esse microrganismo foi o principal responsável pela maioria das infecções invasivas da lesão por queimadura (MCMANUS, 1981; ARSLAN, 1999; KAUSHIK, 2001; SONG, 2001). Porém, em contraste a isso alguns outros estudos indicam uma diminuição da colonização das queimaduras por *Pseudomonas*. Nas observações de Vindenes e Bjerknes em 1995, esse microrganismo foi encontrado em apenas 10,9% de todos os isolados.

As razões para esta alta prevalência de *Pseudomonas aeruginosa* em serviços de queimados são as seguintes: capacidade dessa bactéria de sobreviver e proliferar em ambientes úmidos (SONG, 2001), fatores associados com a aquisição de patógenos nosocomiais em pacientes com recorrência ou longo tempo de hospitalização, prévia administração de agentes antimicrobianos, efeitos imunossupressivos do trauma da queimadura, e outros fatores ainda não conhecidos (ARSLAN,1999;TRADGET, 2004). *Pseudomonas aeruginosa* foi também o microrganismo mais isolado entre os que

apresentaram culturas de biópsia maiores que 10^5 UFC/g de tecido (52%), sendo responsável pela maioria das infecções. Isso poderia também ser explicado pelas enzimas, pelos produtos metabólicos produzidos por essa bactéria e pelas altas taxas de resistência intrínseca e extrínseca à antimicrobianos, o que aumentam o seu potencial invasivo e a rápida expansão da infecção (SHARMA, 1981; BARRET, 2003; MCMANUS, 1980). McManus et al. em 1985, sugeriram que 10% de todos os pacientes queimados desenvolvam bacteremia por *Pseudomonas* spp, o que acarretaria uma taxa de mortalidade de 80% e aumentaria o risco de infecção por esse microrganismo, substancialmente, em queimaduras > 30% de SCQ.

Acinetobacter baumannii emergiu como uma significativa causa de infecção da ferida no presente estudo, sendo o segundo microrganismo mais isolado dentre o total e dentre aqueles que apresentaram contagens superiores a 10^5 UFC/g de tecido, com a frequência de 31% e 32%, respectivamente. As razões para esta aumentada incidência de infecção seriam a presença desse microrganismo, como microbiota normal da pele, isto facilitaria sua transmissibilidade, e sua habilidade para permanecer viável em ambientes hospitalares (AGNIHOTRI, 2004). Podendo ser adquirido de fontes endógenas ou pode se transmitido de fontes exógenas e, subseqüentemente tornar-se endógeno. Em vista da sua capacidade de sobreviver em fômites e na superfície de pacientes (pele, feridas, queimaduras, faringe e trato gastrointestinal), torna-se fácil entender esta rápida tendência de disseminação entre pacientes e sua implicação em epidemias, principalmente nas UTIs. Uma vez instalada a epidemia por este microrganismo, sua erradicação é muito difícil devido, ao seu rápido aumento de resistência para uma variedade de drogas antimicrobianas (HERRUZO, 2004; VINDENES, 1995).

Esse achado de segundo mais prevalente para *Acinetobacter baumannii* contrasta com outros resultados de estudos, que revelaram *Staphylococcus aureus* e *Klebsiela pneumoniae* como os dois isolados mais comuns (AGNIHOTRI, 2004; BREUING, 2003; OZUMBA e JIBURUM, 2000), embora os bacilos gram-negativos geralmente prevaleçam em infecções de queimados. Provavelmente, tal observação se deva ao fato do *Acinetobacter baumannii* estar amplamente distribuído no hospital onde o estudo foi realizado.

A taxa de bactérias gram-positivas foi baixa (14%). Esse achado é consistente com aqueles de outros centros nos quais, cocos gram-positivos são gradualmente substituídos por bacilos gram-negativos, de acordo com o tempo decorrido após a lesão e o tempo de internação (KOMOLAFE, 2003; LARI e ALAGHEHBANDAN, 2000; NASSER, 2003; PRUITT, 1984). *Staphylococcus aureus*, incluindo cepas oxacilina sensível (MSSA) e oxacilina resistente (MRSA), foi o terceiro da lista de microrganismos recuperados no estudo, com uma prevalência de 13% do total de isolados. Tal fato é contraditório em relação a muitas informações prévias, que indicam uma alta frequência de isolamento desse microrganismo (KOMOLAFE, 2003; REVATHI, 1998; VINDENES, 1995).

Segundo Pruitt e McManus (1992), os tipos de microrganismos presentes na escara influenciam a incidência de infecção invasiva, sendo que as infecções da queimadura causada por gram-positivos tendem a ser superficiais e permanecerem localizadas. Entretanto, uma proporção substancial de todas as infecções nosocomiais tem sido mostrada ser devido ao MRSA (TAYLOR, 1992), como nesse estudo em que sua incidência foi de 80% do total de *Staphylococcus aureus* isolado. Desse, apenas cepas de MRSA estiveram presente nas culturas com contagens superiores a 10^5 UFC/g de tecido, com uma prevalência de 9% dos isolados com essa contagem de bactéria. BANG et al. em 2002, verificaram no seu estudo a predominância de septicemia por gram-positivos, isso pode ser devido ao fato, das unidades de queimados serem uma grande fonte de MRSA. Outros fatores que podem contribuir para o aumento da incidência de MRSA são: as falhas para se prevenir transmissão cruzada no hospital, o amplo espectro de antimicrobianos ministrados nesses pacientes, a média alta do tempo de hospitalização, o número de portadores de MRSA dentre o pessoal na unidade de queimados ou no hospital e a existência de uma epidemia de MRSA, dentre outros (ONCUL, 2002). Como esses microrganismos são os maiores problemas clínicos e epidemiológicos em hospitais, principalmente nas UTIs, por serem facilmente transferidos entre pessoas do hospital e entre pacientes (RAM, 2000), grande importância deve ser dada à essa incidência em uma unidade de queimados.

Estafilococo coagulase negativa (ECN) foi recuperado, no estudo, com uma frequência muito baixa (1%), a espécie identificada foi *Staphylococcus epidermidis*. Essa baixa incidência é consistente com prévios estudos de colonização em queimados, nos quais a patogenicidade desse microrganismo tem sido questionada (KARYOUTE, 1989; LAWRENCE, 1985; VINDENES, 1995). Em vista do estado de imunocomprometimento de pacientes gravemente queimados, muitos centros têm constantemente salientado que o ECN poderia ser um significativo patógeno (NASSER, 2003).

Além dos microrganismos gram-negativos não-fermentadores, tivemos o isolamento de outros gram-negativos da família enterobacteriaceae como, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter gergoviae* e *Serratia marcescens*, totalizando 11% dos isolados. Esta baixa incidência está em concordância com alguns estudos cuja taxa de isolamento de *P. mirabilis* e *E. coli* são de 1% e 5%, respectivamente (NASSER, 2003; REVATHI, 1998; VINDENES, 1995). Contudo, em outros estudos, espécies de *Klebsiella* têm aparecido como o primeiro ou o segundo microrganismo mais isolado da ferida por queimadura (OZUMBA, 2000; NASSER, 2003).

O diagnóstico de infecção fúngica, foi estabelecido somente por critérios histológicos, este método detecta significativamente contaminação micótica em lesões não revelada pela correspondente análise microbiológica. As razões para esta discrepância estão sendo estudadas. Isso apareceria como um fenômeno de competição bactéria versus fungo, podendo inibir *in vitro* o desenvolvimento de colônias micóticas (DI LONARDO, 1993; PRUITT, 1973). No entanto, não foram encontrados estruturas fúngicas, dado explicado pelo fato das infecções fúngicas se apresentarem com picos de frequências no trigésimo dia pós-queimadura (LEMOS, 2003). A importância de se pesquisar fungos em queimaduras é o fato de espécies de *Candida* colonizarem a mesma. Esses fungos são geralmente saprófitas inofensivos, mas como invasores de tecido viável da subescara ou da corrente sangüínea, são agressivos patógenos com uma taxa de mortalidade que excede 90% (SPEBAR, 1979).

Biópsia de ferida por queimadura tem atraído relevante atenção sob o passar de vários anos. Maior parte da atenção tem sido focada na utilidade da biópsia como uma

parte de estudos de quantificação bacteriológicos (KAHN, 1979). Pruitt e Foley têm argumentado a importância e a utilização de biópsia de lesão por queimadura para o diagnóstico de infecção microbiológica da ferida, e eles sugerem uma detalhada classificação histopatológica da severidade da infecção. Em concordância com esses dois autores, Loebel et al. (1974b) têm também sugerido que a avaliação histológica pode ser de grande valor diagnóstico e prognóstico. Em suas opiniões o exame histológico é um método confiável de diferenciação entre colonização e infecção invasiva da ferida por queimadura. Já Sjöberg et al. (2003), reportaram o exame histológico de biópsia de pele queimada como sendo uma metodologia superior à microbiologia quantitativa, considerando o diagnóstico de infecção invasiva.

Na prática clínica, tem-se usado biópsia para avaliar a queimadura como uma fonte de infecção em pacientes com clínica de sepse (PRUITT, 1973). A análise é baseada na profundidade de penetração do microrganismo, presença de uma resposta inflamatória, o caráter e a quantidade de drenagem purulenta, evidência de invasão no tecido viável e identificação de envolvimento vascular (PRUITT, 1973; KAHN, 1979). Acredita-se que muitos casos de sepse são causados por fontes endógenas de contaminação bacteriana e que essas fontes estão, principalmente, localizadas na própria queimadura, em estruturas tais como folículo piloso e glândulas sebáceas (BREUING, 2003). Apesar de no presente estudo, não ter sido avaliado a correlação desses achados com a clínica de sepse, fica aqui mais uma evidência da importância da análise histopatológica nesses pacientes.

Os achados histológicos de microrganismos vistos como causa de 21 infecções da ferida foram parecidos, se comparados com o tipo de microrganismo cultivado. A principal dificuldade apresentada no estudo foi quanto à sensibilidade da técnica de Gram em tecido, na distinção das bactérias gram-negativas, já que muitas estruturas dérmicas se coram pela fucsina, como por exemplo resíduos de hemossiderina e melanina. Baixos níveis de crescimento microbiano em tecido foram associados com achados histológicos negativos. Apenas um exemplo de infecção invasiva da ferida por queimadura ocorreu em amostras com densidades microbianas menores que 10^5 UFC/g de tecido, enquanto todos os casos de culturas negativas foram também negativos nos

achados histológicos. Porém, o contrário é que altos níveis de crescimento bacteriano foram mais freqüentemente associados com achados histológicos negativos (57% dos casos), teoricamente indicativos de crescimento bacteriano em tecidos não-viáveis, que com infecção invasiva da ferida, dados compatíveis com estudos de McManus et al. (1987). Esses dados sugerem que técnicas de diagnósticos histológicos e microbiológicos rendem informações equivalentes em feridas não infectadas, mas não há densidade microbiana que, analisada sozinha, permita o diagnóstico de infecção invasiva (MCMANUS et al., 1987).

A boa concordância entre as identificações histológicas e microbiológicas de infecção mostra que alta densidade na cultura indica a necessidade de exame histológico, podendo esses dois métodos ser vistos como adjuntos, representando um passo importante em direção ao melhor entendimento e à melhor definição do problema intrínseco de infecção em pacientes gravemente queimados (DI LONARDO, 1993).

Uma vez demonstrado que a infecção da queimadura surge da microbiota colonizadora, o conhecimento desta microbiota pode ser útil para guiar a seleção apropriada do antimicrobiano, em um evento que ocorra a infecção ou, para imediata instituição de isolamento preventivo de pacientes com microrganismos resistentes, tais como MRSA, *Enterococcus* resistente à vancomicina ou gram-negativos multiresistentes (ELSAYED, 2003).

O padrão de sensibilidade das bactérias é tema para freqüentes modificações, tais como avaliação da instituição de uma simples medidas de controle de infecção, como lavagem das mãos antes e depois do atendimento ao paciente e restrição da movimentação de pessoas em unidades de queimados (OZUMBA, 2000; SONG, 2001). Essa avaliação é importante para propósitos epidemiológicos e clínicos, já que muitos dos isolados são resistentes aos antimicrobianos disponíveis. No estudo, a droga mais ativa contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* foi polimixina B, com 100% de sensibilidade. O imipenem apresentou 78% de sensibilidade para *P. aeruginosa* e 75% para *A. baumannii* e o meropenem 65% e 75% para as mesmas espécies, respectivamente. A incidência de *P. aeruginosa* resistente ao imipenem (23%) foi alta e bem parecido com o encontrado em estudo de Song *et al* em 2001 (29%).

Pseudomonas aeruginosa foi sensível a ceftazidima (70%) em contraste com estudos na Nigéria, os quais mostraram 100% de sensibilidade a esse antibiótico (ATOYEI, 1992). Amicacina foi apenas 48% susceptível, contudo outro estudo mostrou 100% de susceptibilidade para *Pseudomonas aeruginosa* (SIGNORINI, 1992). Os outros isolados gram-negativos foram 100% sensíveis a ciprofloxacina, como verificado por outros estudos (ARSLAN, 1999; REVATHI, 1998);

As drogas mais ativas contra os microrganismos gram-positivos comumente isolados foram vancomicina e linezolide, como em outros estudos (KAUSHIK, 2001; SONG, 2001). Sendo que, teicoplanina também apresentou máxima sensibilidade (100%) para os isolados testados. A frequência de isolados de *S. aureus* resistentes à oxacilina (MRSA) foi relativamente alta, 67% dos isolados de *S. aureus*. Essa bactéria tem se tornada endêmica em muitos centros que atendem queimados. Sua disseminação é rápida pela fácil transmissão entre pacientes e entre profissionais que cuidam desses pacientes (CUNHA, 2005).

A freqüente introdução de novos antimicrobianos no cenário clínico resulta em contínuas mudanças dos padrões de susceptibilidade dentre os patógenos (RAM, 2000). A direta relação entre o uso de agentes antimicrobianos e a prevalência de bactérias resistentes têm sido documentado em várias ocasiões especialmente na UTIs (HSUEH, 1998). O meio ambiente hospitalar é o principal foco para o surgimento e disseminação de bactérias resistentes a antimicrobianos (RAM, 2000) e a superpopulação em uma unidade de queimados é uma importante causa de infecção cruzada (GUPTA, 1993). A taxa de mortalidade observada foi menor que o reportado por outros estudos, os quais são altos, tais como 75% (ROSSI, 1998; TANEJA, 2004). Continua observação clínica, vigilância microbiológica, rápida detecção de septicemia, apropriados antimicrobianos, cuidados com nutrição, precoce cobertura da ferida podem provavelmente ser atribuídos à baixa taxa de mortalidade nesses pacientes estudados.

6. CONCLUSÕES

1. O álcool foi o principal agente causador de lesões termiais. O sexo masculino teve uma maior prevalência em relação ao feminino. A média da superfície corporal queimada (SCQ) foi relativamente alta, porém a taxa de óbitos foi baixa.
2. O cálculo quantitativo do estudo do fragmento de pele queimada tem valor preditivo de infecção nos pacientes queimados, uma vez que ele nos fornece uma maior facilidade de identificação, quantificação e isolamento do microrganismo na profundidade da lesão, bem como evidencia invasão bacteriana tissular.
3. A cultura semiquantitativa de biópsia deve ser feita como rotina, por se tratar de uma técnica precisa e de fácil execução, sobretudo nos pacientes com maior risco de desenvolver infecção, auxiliando na prevenção e no diagnóstico de complicações infecciosas. A importância de biópsias serial no cuidado ao paciente queimado é indicada pelo valor prognóstico de gradativas mudanças na infecção da ferida
4. A porcentagem de culturas com contagens $> 10^5$ UFC/g de tecido foi elevada, demonstrando que biópsia de pele queimada coletada entre o 7º e 9º dias de após a lesão correlaciona-se muito bem com o período em que realmente ocorre a maioria das infecções. No entanto, esse dado de ser avaliado juntamente com dados do paciente, como SCQ, idade e clínica.
5. *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* foram os microrganismos de maior prevalência dentre os isolados no estudo. Essas bactérias apresentaram perfis variados de sensibilidades aos antimicrobianos, porém muitas apresentaram multiresistência, sendo sensível a um limitado espectro de antimicrobianos. A determinação desse perfil foi útil para que pudesse ser iniciado ou mudasse a terapêutica antimicrobiana.

6. A cultura de biópsia mostrou-se uma técnica mais confiável para identificar os verdadeiros patógenos, em feridas por queimaduras, que a cultura de superfície por *swab*. Pois, pode-se constatar nessa um elevado número de culturas com crescimento de vários tipos de microrganismos, representando a contaminação da amostra.
7. Com a análise histológica do tecido é possível visualizar o microrganismo nos vários planos do tecido e distingui-los em gram-positivo e gram-negativo. Sendo considerado um método confiável no diagnóstico de infecção invasiva sobre colonização. Porém, os resultados desse exame não devem ser interpretados de maneira isolada, sendo importante a análise conjunta com achados clínicos e laboratoriais.
8. Houve uma grande correlação entre os achados negativos de biópsia e histopatológico, bem como do tipo de microrganismo envolvido em infecção da ferida. Porém, o diagnóstico de infecção na análise histológica mostrando bactéria invadindo tecido viável, não teve uma correlação em quase metade das culturas com contagens $> 10^5$ UFC/g de tecido.
9. A cultura de biópsia e a análise histológica fornecem informações úteis com relação a microbiota e a localização dessa na ferida por queimadura, possibilitando um melhor entendimento sobre a mesma e seus padrões de sensibilidade em relação à possibilidade de infecção invasiva. Devendo portanto, ser realizados em conjunto com a monitoração por *swabs*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, S. L. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas, and Other Enterobacteriaceae*. In: Murray, P. R. (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**. Washington, DC: ASM Press, 2003. p. 684-700.
- AEILTS, G. D. et al. Methicillin-resistant-*Staphylococcus aureus* colonization and infection in a rehabilitation facility. **J Clin Microbiol**, v. 16, n. 2, Aug, p. 218-23. 1982.
- AGNIHOTRI, N.; GUPTA, V.; JOSHI, R. M. Aerobic bacterial isolates from burn wound infections and their antibiograms--a five-year study. **Burns**, v. 30, n. 3, May, p. 241-3. 2004.
- ALAGHEHBANDAN, R.; MACKAY, R. A.; RASTEGAR LARI, A. Pediatric burn injuries in Tehran, Iran. **Burns**, v.,27, n.,2, Mar, p.,115-8. 2001.
- ALTOPARLAK, U. et al. The time-related changes of antimicrobial resistance patterns and predominant bacterial profiles of burn wounds and body flora of burned patients. **Burns**, v. 30, n. 7, Nov, p. 660-4. 2004.
- ALTOPARLAK, U. et al. Prevalence of metallo-beta-lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from burn wounds and in vitro activities of antibiotic combinations against these isolates. **Burns**, v. 31, n. 6, Sep, p. 707-10. 2005.
- APPELGREN, P. et al. A prospective study of infections in burn patients. **Burns**, v. 28, n. 1, Feb, p. 39-46. 2002.
- ARSLAN, E. et al. Gram-negative bacterial surveillance in burn patients. **Annals Burns Fire Disaster**, v. 11, n 2, Jun. 1999.
- ATOYEBI, O. A. et al. Bacterial flora of burn wounds in Lagos, Nigeria: a prospective study. **Burns**, v. 18, n. 6, Dec, p. 448-51. 1992.
- BANG, R. L. et al. Septicaemia after burn injury: a comparative study. **Burns**, v. 28, n. 8, Dec, p. 746-51. 2002.
- BANNERMAN, T. M. *Staphylococcus, Micrococcus and other catalase-positive cocci that grow aerobically*. Murray, P. R. (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**. Washington, DC: ASM Press, 2003. p.384-404.
- BARRET, J. P.; JESCHKE, M. G.; HERNDON, D. N. Selective decontamination of the digestive tract in severely burned pediatric patients. **Burns**, v. 27, n. 5, Aug, p. 439-45. 2001.

BARRET, J. P.; HERNDON, D. N.. Effects of burn wound excision on bacterial colonization and invasion. **Plast Reconstr Surg**, v. 111, n. 2, Feb, p. 744-50; discussion 751-2. 2003.

BENNETT, J. V.; BRACHMAN, P. S. Infection of burn wound. In: Hospital Infection. Philadelphia: Lippincott: Raven Publishers, 1998, p.587-597.

BERNAL, F. J. G., et al. Bacteriology in burn patients undergoing mechanical ventilation. **Burns**, v. 26, n. 8, March, p. 731-6. 2000.

BHARADWAJ, R.; PHADKE, S. A.; JOSHI, B. N. Bacteriology of burn wound using the quantitative full thickness biopsy technique. **Indian J Med Res**, v. 78, Sep, p. 337-42. 1983.

BOUZA, E. et al. Semiquantitative culture of open surgical wounds for diagnosis of surgical site infection. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 23, n. 2, Feb, p. 119-22. 2004.

BOWLER, P. G.; DUERDEN B. I.; ARMSTRONG, D. G.. Wound microbiology and associated approaches to wound management. **Clin Microbiol Rev**, v. 14, n. 2, Apr, p. 244-69. 2001.

BREIDENBACH, W. C.; TRAGER, S. Quantitative culture technique and infection in complex wounds of the extremities closed with free flaps. **Plast Reconstr Surg**, v. 95, n. 5, Apr, p. 860-5. 1995.

BREUING, K. et al. Wound fluid bacterial levels exceed tissue bacterial counts in controlled porcine partial-thickness burn infections. **Plast Reconstr Surg**, v. 111, n. 2, Feb, p. 781-8. 2003.

BUCHANAN, K. et al. Comparison of quantitative and semiquantitative culture techniques for burn biopsy. **J Clin Microbiol**, v. 23, n. 2, Feb, p. 258-61. 1986.

CHALEKSON, C. P.; NEUMEISTER, M. W.; JAYNES, J. Improvement in burn wound infection and survival with antimicrobial peptide D2A21 (Demegel). **Plast Reconstr Surg**, v. 109, n. 4, Apr 1, p. 1338-43. 2002.

CHAPMAN, G. H. The significance of sodium chloride in studies of *Staphylococci*. **J Lab Clin Med**, v. 22, Marc, p. 201-03. 1945.

CHITKARA, Y. K. Transferable drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative organisms in burns. **Am J Clin Pathol**, v. 59, n. 2, Feb, p. 211-5. 1973.

COOK, N. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* versus the burn patient. **Burns**, v. 24, n. 2, Mar, p. 91-8. 1998.

CUNHA, B. A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: clinical manifestations and antimicrobial therapy. **Clin Microbiol Infect**, v. 11 Suppl 4, Jul, p. 33-42. 2005.

DALAMAGA, M. et al. *Stenotrophomonas maltophilia*: a serious and rare complication in patients suffering from burns. **Burns**, v. 29, n. 7, Nov, p. 711-3. 2003.

DI LONARDO, A. et al. Histological assessment of the level of burn wound infection: diagnostic and therapeutic strategies. **Ann Medit Burns Club**, v. 6, n. 2, Jun. 1993.

EDLICH, R. F. et al. Practical bacteriologic monitoring of the burn victim. **Clin Plast Surg**, v. 4, n. 4, Oct, p. 561-9. 1977.

EDWARDS-JONES, V.; GREENWOOD, J. E. What's new in burn microbiology? James Laing Memorial Prize Essay 2000. **Burns**, v. 29, n. 1, Feb, p. 15-24. 2003.

EHA Consulting Group. ***Pseudomonas aeruginosa***. Disponível em: <<http://www.ehagroup.com/epidemiology/illnesses/pseudomonas-aeruginosa.asp>> Acesso em 6 jan. 2006.

ELSAYED, S. et al. Utility of Gram stain for the microbiological analysis of burn wound surfaces. **Arch Pathol Lab Med**, v. 127, n. 11, Nov, p. 1485-8. 2003.

EROL, S. et al. Changes of microbial flora and wound colonization in burned patients. **Burns**, v. 30, n. 4, Jun, p. 357-61. 2004.

FERNANDES, A. T. et al. Infecção em Queimados. In: _____. **Infecção Hospitalar e Suas Interfaces na Área da Saúde**, Rio de Janeiro: Atheneu, 2004. p.657-669.

FONTANA, C.; DOMINGOS, M. M; FERREIRA, M. C. Estudo epidemiológico das queimaduras. **Rev da Soc Bras Cir Plast Est Reconst**, v. 9, n 2,3, p. 57-60. 1994.

FRESHWATER, M. F.; SU, C. T. Potential pitfalls of quantitative burn wound biopsy cultures. **Ann Plast Surg**, v. 4, n. 3, Mar, p. 216-8. 1980.

FUCHS, P. et al. MRSA-retrospective analysis of an outbreak in the burn centre Aachen. **Burns**, v. 28, n. 6, Sep, p. 575-8. 2002.

GANG, R. K. et al. Rifampicin as an adjunct to vancomycin therapy in MRSA septicaemia in burns. **Burns**, v. 25, n. 7, Nov, p. 640-4. 1999.

GEORGIADIS, N. G. et al. A comparison of methods for the quantitation of bacteria in burn wounds. I. Experimental evaluation. **Am J Clin Pathol**, v. 53, n. 1, Jan, p. 35-9. 1970.

GILLICAN, P.H. et al. *Burkholderia, Stenotrophomonas, Ralstonia, Brevundimonas, Comamonas, Delftia, Pandoraea, and Acidovorax*. In: Murray, P. R. (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**. Washington, DC: ASM Press, 2003. p. 729-740

GOMES, D. R. Fisiologia e Fisiopatologia In: _____. **Queimaduras**, Rio de Janeiro: Revinter Ltda, 1995. p.37-42.

GRABER, C. D. et al. Bacteriophage grouping of *Pseudomonas aeruginosa*, with special emphasis on lysotypes occurring in infected burns. **Am J Clin Pathol**, v. 37, Jan, p. 54-62. 1962.

GUPTA, M. et al. Burn epidemiology: the Pink City scene. **Burns**, v. 19, n. 1, Feb, p. 47-51. 1993.

HEIMBACH, D. et al. Burn depth: a review. **World J Surg**, v. 16, n. 1, Jan-Feb, p. 10-5. 1992.

HERRUZO-CABRERA, R. et al. [Risk factors for local infection in burns. Multivariate study]. **Med Clin (Barc)**, v. 106, n. 3, Jan 27, p. 91-4. 1996.

HERRUZO-CABRERA, R.; GARCIA-CABALLERO, J.; FERNANDEZ-ACENERO, M. J. A new alcohol solution (N-duopropenide) for hygienic (or routine) hand disinfection is more useful than classic handwashing: in vitro and in vivo studies in burn and other intensive care units. **Burns**, v. 27, n. 7, Nov, p. 747-52. 2001.

HERRUZO-CABRERA, R. et al. Two consecutive outbreaks of *Acinetobacter baumannii* 1-a in a burn Intensive Care Unit for adults. **Burns**, v. 30, n. 5, Aug, p. 419-23. 2004.

HOLDER, I. A.; NEELY, A. N. Fear of MRSA--potential for future disaster. **Burns**, v. 24, n. 2, Mar, p. 99-103. 1998.

HSUEH, P. R. et al. Persistence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in an intensive care burn unit. **J Clin Microbiol**, v. 36, n. 5, May, p. 1347-51. 1998.

ITO, C. A. S. **Ácido nalidíxico como marcador preditivo de sensibilidade às fluorquinolonas em *Escherichia coli* isoladas de uroculturas**. Curitiba, 2004. 100 f.
Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

JORGENSEN, J. H.; TURNIDGE, J.D. Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. In: Murray, P. R. (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**. Washington, DC: ASM Press, 2003. p.1108-1127.

KAHN, A. M.; MCCRADY, V. L.; ROSEN, V. J. Burn wound biopsy. Multiple uses in patient management. **Scand J Plast Reconstr Surg**, v. 13, n. 1, p. 53-6. 1979.

KAO, C. C. e W. L. GARNER. Acute Burns. **Plast Reconstr Surg**, v. 101, n. 7, Jun, p. 2482-2493. 2000.

KARYOUTE, S. M. Burn wound infection in 100 patients treated in the burn unit at Jordan University Hospital. **Burns**, v. 15, n. 2, Apr, p. 117-9. 1989.

KAUSHIK, R., et al. Bacteriology of burn wounds--the first three years in a new burn unit at the Medical College Chandigarh. **Burns**, v. 27, n. 6, Sep, p. 595-7. 2001.

KISKA, D. L.; GILLIGAN, P.H. *Pseudomonas*. In: Murray, P. R. (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**. Washington, DC: ASM Press, 2003. p. 719-728.

KOMOLAFE, O. O. et al. Bacteriology of burns at the Queen Elizabeth Central Hospital, Blantyre, Malawi. **Burns**, v. 29, n. 3, May, p. 235-8. 2003.

KONEMAN, E. W. A. et al. **Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas Colorido** (Ed.). 5 ed. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica Ltda., 2001. p. 97-99. Cap. 2.

KOOISTRA-SMID, M. et al. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* colonization in a burn center. **Burns**, v. 30, n. 1, Feb, p. 27-33. 2004.

KRIZEK, T. J. ; DAVIS, J. H. Experimental *Pseudomonas* burn sepsis--evaluation of topical therapy. **J Trauma**, v. 7, n. 3, May, p. 433-42. 1967.

KRUPP, S. et al. Current concepts in pediatric burn care: management of burn wounds with cultured epidermal autografts. **Eur J Pediatr Surg**, v. 2, n. 4, Aug, p. 210-5. 1992.

LARI, A. R.; ALAGHEHBANDAN, R. Nosocomial infections in an Iranian burn care center. **Burns**, v. 26, n. 8, Dec, p. 737-40. 2000.

LAWRENCE, J. C. The bacteriology of burns. **J Hosp Infect**, v. 6 Suppl B, Sep, p. 3-17. 1985.

LAWRENCE, J. C. Burn bacteriology during the last 50 years. **Burns**, v. 18 Suppl 2, p. S23-9. 1992.

LEE, J. J. et al. Infection control in a burn center. **J Burn Care Rehabil**, v. 11, n. 6, Nov-Dec, p. 575-80. 1990.

LEMOS, T. et al. Valor do Estudo histopatológico do fragmento de pele no diagnóstico precoce de infecção da criança queimada. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 3, n. 3, Set./Dez., p. 13-25. 2003.

LEONARDI, D. et al. Estudo epidemiológico retrospectivo de queimaduras em crianças no estado do Rio Grande do Sul – Brasil. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 2, n. 2, Mai/Agos, p. 10-14. 2002

LESSEVA, M. I.; HADJIISKI, O. G. Staphylococcal infections in the Sofia Burn Centre, Bulgaria. **Burns**, v. 22, n. 4, Jun, p. 279-82. 1996.

LEVINE, N. S. et al. The quantitative swab culture and smear: A quick, simple method for determining the number of viable aerobic bacteria on open wounds. **J Trauma**, v. 16, n. 2, Feb, p. 89-94. 1976.

LOEBL, E. C. et al. The method of quantitative burn-wound biopsy cultures and its routine use in the care of the burned patient. **Am J Clin Pathol**, v. 61, n. 1, Jan, p. 20-4. 1974(a).

LOEBL, E. C. et al. The use of quantitative biopsy cultures in bacteriologic monitoring of burn patients. **J Surg Res**, v. 16, n. 1, Jan, p. 1-5. 1974(b).

LUZZARO, F. et al. Prevalence and characterization of metallo-beta-lactamases in clinical isolates of pseudomonas aeruginosa. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 48, n. 2, Feb, p. 131-5. 2004.

MACFADDIN, J. F. **Biochemical Tests for Identifications of Medical Bacteria**. 3th. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

MABROUK, A.; MAHER, A.; NASSER. S. An epidemiologic study of elderly burn patients in Ain Shams University Burn Unit, Cairo, Egypt. **Burns**, v. 29, n. 7, Nov, p. 687-90. 2003.

MARCHESAN, W. G.; FARINA JR., J. A. Tratamento da ferida queimada. In: JORGE, S. A.; SÔNIA, R. P. D. **Abordagem Multidisciplinar do Tratamento de Feridas**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. p. 163-208.

MARVIN, J. A. et al. Usefulness of blood cultures in confirming septic complications in burn patients: evaluation of a new culture method. **J Trauma**, v. 15, n. 8, Aug, p. 657-62. 1975.

MAZA L. M. et al. Gram Stain. In: _____. **Color Atlas of Diagnostic Microbiology**. St Louis, Missouri: Editora Mosby, 1997. p. 25.

MCMANUS A. T. et al. Bacterial motility: a component in experimental *Pseudomonas aeruginosa* burn wound sepsis. **Burns**, v. 6, n. 4, Jun, p. 235-239. 1980.

MCMANUS, W. F. et al. Burn wound infection. **J Trauma**, v. 21, n. 9, Sep, p. 753-6. 1981.

MCMANUS, A. T.; MCLEOD JR., C. G; MASON, A. D. JR. Experimental *Proteus mirabilis* burn surface infection. **Arch Surg**, v. 117, n. 2, Feb, p. 187-91. 1982.

MCMANUS, A. T., et al. Microbial colonization in a new intensive care burn unit. A prospective cohort study. **Arch Surg**, v. 120, n. 2, Feb, p. 217-23. 1985.

MCMANUS, A. T. et al. Comparison of quantitative microbiology and histopathology in divided burn-wound biopsy specimens. **Arch Surg**, v. 122, n. 1, Jan, p. 74-6. 1987.

MCMANUS, A. T. et al. A decade of reduced gram-negative infections and mortality associated with improved isolation of burned patients. **Arch Surg**, v. 129, n. 12, Dec, p. 1306-9. 1994.

MORGAN, E. D.; BLEDSOE, S. C.; BARKER, J. Ambulatory management of burns. **Am Fam Physician**, v. 62, n. 9, Nov 1, p. 2015-26, 2029-30, 2032. 2000.

MOZINGO, D. W. et al. Incidence of bacteremia after burn wound manipulation in the early postburn period. **J Trauma**, v. 42, n. 6, Jun, p. 1006-10; discussion 1010-1. 1997.

MOZINGO, D. W.; MCMANUS, A. T.; PRUITT JR, B. A. Infection of burn wound. In: BENNETT, J. V.; BRACHMAN, P. S. **Hospital Infection**. Philadelphia: Lippincott – Raven Publishers, 1998. p. 587-597.

NASSER, S.; MABROUK, A.; MAHER, A. Colonization of burn wounds in Ain Shams University Burn Unit. **Burns**, v. 29, n. 3, May, p. 229-33. 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE / NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (CLSI/NCCLS). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: global informational supplement M100- S15**. NCCLS, 2005.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (CLSI/NCCLS). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard. 6th. ed. NCCLS document M7-A6. USA, 2003.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (CLSI/NCCLS). **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**. Approved standard. 7th. ed. NCCLS document M2-A8. USA, 2003.

OGLE, J. W.; RELLER, L. B.; VASIL, M. L. Development of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem, norfloxacin, and ciprofloxacin during therapy: proof provided by typing with a DNA probe. **J Infect Dis**, v. 157, n. 4, Apr, p. 743-8. 1988.

ONCUL, O. et al. The evaluation of nosocomial infection during 1-year-period in the burn unit of a training hospital in Istanbul, Turkey. **Burns**, v. 28, n. 8, Dec, p. 738-44. 2002.

OZKURT, Z. et al. The risk factors for acquisition of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the burn unit. **Burns**, v. 31, n. 7, Nov, p. 870-3. 2005.

OZUMBA, U. C. e B. C. JIBURUM. Bacteriology of burn wounds in Enugu, Nigeria. **Burns**, v. 26, n. 2, Mar, p. 178-80. 2000.

PALLUA, N. et al. A new technique for quantitative bacterial assessment on burn wounds by modified dermabrasion. **J Hosp Infect**, v. 42, n. 4, Aug, p. 329-37. 1999.
PAPP, A. et al. The progression of burn depth in experimental burns: a histological and methodological study. **Burns**, v. 30, n. 7, Nov, p. 684-90. 2004.

PECK, M. D. et al. Surveillance of burn wound infections: a proposal for definitions. **J Burn Care Rehabil**, v. 19, n. 5, Sep-Oct, p. 386-9. 1998.

PIRNAY, J. P. et al. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in a burn unit: persistence of a multidrug-resistant clone and a silver sulfadiazine-resistant clone. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 3, Mar, p. 1192-202. 2003.

PRASANNA, M.; THOMAS, C. A profile of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infection in the burn center of the Sultanate of Oman. **Burns**, v. 24, n. 7, Nov, p. 631-6. 1998.

PRINCE, A. Adhesins and receptors of *Pseudomonas aeruginosa* associated with infection of the respiratory tract. **Microb Pathog**, v. 13, n. 4, Oct, p. 251-60. 1992.

PRUITT JR., B. A.; FOLEY, F. D. The use of biopsies in burn patient care. **Surgery**, v. 73, n. 6, Jun, p. 887-97. 1973.

PRUITT JR., B. A. The diagnosis and treatment of infection in the burn patient. **Burns Incl Therm Inj**, v. 11, n. 2, Dec, p. 79-91. 1984.

PRUITT JR., B. A; MCMANUS, A. T. The changing epidemiology of infection in burn patients. **World J Surg**, v. 16, n. 1, Jan-Feb, p. 57-67. 1992.

PRUITT JR., B. A. et al. Burn wound infections: current status. **World J Surg**, v. 22, n. 2, Feb, p. 135-45. 1998.

RAM, S. et al. Prevalence of multidrug resistant organisms in an intensive care burn unit. **Indian J Med Res**, v. 111, Apr, p. 118-20. 2000.

RASTEGAR LARI, A.; BAHRAMI HONAR, H.; ALAGHEHBANDAN, R. *Pseudomonas* infections in Tohid Burn Center, Iran. **Burns**, v. 24, n. 7, Nov, p. 637-41. 1998.

REARDON, C. M. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in burns patients-- why all the fuss? **Burns**, v. 24, n. 5, Aug, p. 393-7. 1998.

REIMER, L. G.; CARROL, K.C. Procedures for the storage of microorganisms. In: Murray, P. R. (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**. Washington, DC: ASM Press, 2003. p. 67-73.

REVATHI, G.; PURI, J.; JAIN, B. K. Bacteriology of burns. **Burns**, v. 24, n. 4, Jun, p. 347-9. 1998.

ROBERTS, S. A., FINDLAY, R.; LANG, S. D. Investigation of an outbreak of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care burns unit. **J Hosp Infect**, v.48, n. 3, Jul, p. 228-32. 2001.

ROBSON, M. C.; HEGGERS, J. P. Bacterial quantification of open wounds. **Mil Med**, v. 134, n. 1, Jan, p. 19-24. 1969.

ROBSON, M. C. Bacterial control in the burn wound. **Clin Plast Surg**, v. 6, n. 4, Oct, p. 515-22. 1979.

ROBSON, M. C. Wound infection. A failure of wound healing caused by an imbalance of bacteria. **Surg Clin North Am**, v. 77, n. 3, Jun, p. 637-50. 1997.

ROSSI, L. A. et al. Queimaduras: características dos casos tratados em um hospital escola em Ribeirão Preto, (SP), Brasil. **Rev Panam Salud Publica/ Pan Am J Public Health**, v. 4, n 6, Ago, p. 401-4. 1998.

ROSSOLINI, G. M.; MANTENGOLI, E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Clin Microbiol Infect**, v. 11 Suppl 4, Jul, p. 17-32. 2005.

RUTALA, W. A. et al. Environmental study of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic in a burn unit. **J Clin Microbiol**, v. 18, n. 3, Sep, p. 683-8. 1983.

SCHRECKENBERGER, P. C. et al. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and Other Nonfermentative Gram-Negative Rods. In: Murray, P. R. (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**. Washington, DC: ASM Press, 2003. p. 749-779.

SHARMA, V. K.; AGARWAL, D. S.; SATYANAND. Bacteriological study of infection in patients with burns. *Indian J Med Res*, v. 73, May, p. 697-709. 1981.

SHERERTZ, R. J.; SULLIVAN, M. L. An outbreak of infections with *Acinetobacter calcoaceticus* in burn patients: contamination of patients' mattresses. *J Infect Dis*, v. 151, n. 2, Feb, p. 252-8. 1985.

SHULMAN, G.; PETRO, J. A.; HALLGREN, E. H. Quantitative bacteriology in wound care. *Am Surg*, v. 45, n. 6, Jun, p. 374-7. 1979.

SIGNORINI, M. et al. Updated evaluation of the activity of antibiotics in a burn centre. *Burns*, v. 18, n. 6, Dec, p. 500-3. 1992.

SJÖBERG, T. et al. Comparison of surface swab cultures and quantitative tissue biopsy cultures to predict sepsis in burn patients: a prospective study. *J Burn Care Rehabil*, v. 24, n. 6, Nov-Dec, p. 365-70. 2003.

SMITH, R. F. et al. Bacteremia and postmortem microbiology in burned children. *Am J Clin Pathol*, v. 63, n. 4, Apr, p. 502-8. 1975.

SONG, W. et al. Microbiologic aspects of predominant bacteria isolated from the burn patients in Korea. *Burns*, v. 27, n. 2, Mar, p. 136-9. 2001.

SPEBAR, M. J.; LINDBERG, R. B. Fungal infection of the burn wound. *Am J Surg*, v. 138, n. 6, Dec, p. 879-82. 1979.

STEER, J. A. et al. Quantitative microbiology in the management of burn patients. I. Correlation between quantitative and qualitative burn wound biopsy culture and surface alginate swab culture. *Burns*, v. 22, n. 3, May, p. 173-6. 1996(a).

STEER, J. A. et al. Quantitative microbiology in the management of burn patients. II. Relationship between bacterial counts obtained by burn wound biopsy culture and surface alginate swab culture, with clinical outcome following burn surgery and change of dressings. *Burns*, v. 22, n.3, May, p. 177-81. 1996(b).

STINGHEN, A. E. M.; ALBINI, C. G.; SOUZA, H. A. P. H. M. **Coloração de Gram – Como fazer, interpretar e padronizar**. 2. ed. Curitiba: Microscience, p. 5 – 8, 2003.

TANEJA, N. et al. A prospective study of hospital-acquired infections in burn patients at a tertiary care referral centre in North India. *Burns*, v. 30, n. 7, Nov, p. 665-9. 2004.

TAYLOR, G. D. et al. Predominance of staphylococcal organisms in infections occurring in a burns intensive care unit. *Burns*, v. 18, n. 4, Aug, p. 332-5. 1992.

- TEPLITZ, C. et al. *Pseudomonas* Burn Wound Sepsis. I Pathogenesis of Experimental *Pseudomonas* Burn Wound Sepsis. **J Surg Res**, v. 54, May, p. 200-16. 1964.
- TEPLITZ, C. Patologia das queimaduras e fundamentos de suas infecções. In: ARTZ, C. P.; MONCRIEF, J. A.; PRUITT, B. A. **Queimaduras**. Rio de Janeiro: Editora Interamericana, 1980. p. 41-84.
- THOMAS, E. T. et al. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in a general hospital: a four-year study. *J Clin Microbiol*, v. 2, n. 5, Nov, p. 397-402. 1975.
- THOMSON, P. D.; SMITH JR., D.J. What is infection. **Am J Surg.**, v. 167(1A): 7S-10S; Jan, discussion 10S-11S. 1994.
- TOCANTINS, R.; GOMES, D. R. Queimaduras. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 55, n. 1, Jul, p. 40-56. 1988
- TREDGET, E. E. et al. *Pseudomonas* infections in the thermally injured patient. **Burns**, v. 30, n. 1, Feb, p. 3-26. 2004.
- TROP, M. et al. Toxic shock syndrome in a scald burn child treated with an occlusive wound dressing. **Burns**, v. 30, n. 2, Mar, p. 176-80. 2004.
- VASIL, M. L.; OCHSNER, U. A. The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. **Mol Microbiol**, v. 34, n. 3, Nov, p. 399-413. 1999.
- VINDENES, H.; BJERKNES, R. Microbial colonization of large wounds. **Burns**, v. 21, n. 8, Dec, p. 575-9. 1995.
- VOLENEC, F. J. et al. Burn wound biopsy bacterial quantitation: a statistical analysis. **Am J Surg**, v. 138, n. 5, Nov, p. 695-7. 1979.
- VOSS, A. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 13, n. 1, Jan, p. 50-5. 1994.
- WANG, S. H. et al. Healthcare-associated outbreak due to pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in a surgical intensive care unit. **J Hosp Infect**, v. 53, n. 2, Feb, p. 97-102. 2003.
- WATTS, A. M. et al. Burn depth and its histological measurement. **Burns**, v. 27, n. 2, Mar, p. 154-60. 2001.
- WILLIAMS, H. B. et al. Are burn wound biopsies obsolete? A comparative study of bacterial quantitation in burn patients using the absorbent disc and biopsy techniques. **Ann Plast Surg**, v. 13, n. 5, Nov, p. 388-95. 1984.

WISPLINGHOFF, H.; PERBIX, W.; SEIFERT, H. Risk factors for nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii*: a case-control study of adult burn patients. **Clin Infect Dis**, v. 28, n. 1, Jan, p. 59-66. 1999.

WONG, T. H. et al. Multi-resistant *Acinetobacter baumannii* on a burns unit--clinical risk factors and prognosis. **Burns**, v. 28, n. 4, Jun, p. 349-57. 2002.

WOOLFREY, B. F.; FOX, J. M.; QUALL, C. O. An evaluation of burn wound quantitative microbiology. I. Quantitative eschar cultures. **Am J Clin Pathol**, v. 75, n. 4, Apr, p. 532-7. 1981.

WURTZ, R., et al. Nosocomial infections in a burn intensive care unit. **Burns**, v. 21, n. 3, May, p. 181-4. 1995.

YIP, A. W. et al. A new semiquantitative culture method for early detection of surgical incisional wound infection. **J Infect Dis**, v. 161, n. 5, May, p. 972-6. 1990.

ZIEGLER, T. R. et al. Increased intestinal permeability associated with infection in burn patients. **Arch Surg**, v. 123, n. 11, Nov, p. 1313-9. 1988.

ANEXOS

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

- Leia atentamente as Informações ao Paciente e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- Faça perguntas sobre quaisquer dúvidas ou se precisar de mais informações.

Local do estudo: Serviço de Queimados do HUEC	
Investigador (a): Vasco, Jannaina Ferreira de Melo	
Paciente:	
Data de nascimento:	Sexo:
Responsável legal (tutor) do paciente (se paciente menor de idade, aos cuidados do tutor): Se aplicável, grau de parentesco do responsável legal.	
Testemunha (se necessário, caso o paciente seja incapaz de ler e/ ou fornecer consentimento por escrito):	

- Fui informado verbalmente e por escrito, pelo médico (e/ou investigador), sobre os objetivos e os procedimentos do estudo, assim como sobre os efeitos esperados, possíveis benefícios e desvantagens, e sobre quaisquer riscos em potencial.
- Li e compreendi as informações relevantes expressas por escrito datadas de 10 de agosto de 2004. Minhas perguntas sobre minha participação nesse estudo foram respondidas adequadamente. Posso reter o folheto de informação ao paciente e receberei uma cópia de meu Termo de Consentimento concedido por escrito.
- Tive tempo suficiente para decidir sobre minha participação ou não.
- Concordo que meus registros clínicos originais podem ser divulgados para inspeção a especialistas autorizados, assim como os membros das autoridades e do Comitê de Ética em Pesquisa, embora mantendo sua estrita natureza confidencial. Compreendo que isso significa que meus dados clínicos podem ser transferidos eletronicamente para outros países.
- Minha participação nesse estudo é de minha livre e espontânea vontade. Posso retirar meu consentimento de participação a qualquer tempo e sem apresentar qualquer justificativa. Essa desistência não resultará em qualquer desvantagem ao meu futuro tratamento clínico.
- Estou ciente de que todas as exigências e limitações indicadas nas informações ao paciente devem ser obedecidas durante o estudo. O investigador clínico pode me excluir do estudo a qualquer momento, a bem da minha saúde.
- Concordo com que meus dados clínicos sejam usados para pesquisas clínicas no futuro.

Local, data

Assinatura do(a) paciente

Local, data

Assinatura do responsável legal(tutor,se aplicável)

Local, data

Assinatura da testemunha (se aplicável)

Local, data

Assinatura do(a) investigador(a)

ANEXO II

TERMOS DE APROVAÇÃO DOS COMITÊS DE ÉTICA



Curitiba, 29 de setembro de 2005.

Ilmo (a) Sr. (a)
Cristina Leise Bastos Monteiro
Jannaina Ferreira de Melo Vasco
Nesta

Prezado Pesquisador:

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado “CORRELAÇÕES DO ESTUDO HISTOPATOLÓGICO E CULTURA SEMIQUANTITATIVA DE BIOPSIA NO DIAGNÓSTICO DE INFECCÃO DE FERIDA QUEIMADA”, foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 27 de setembro de 2005. O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e demais, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

Protocolo CEP: 1113.152/2005-09

Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do primeiro relatório: 27 de abril de 2006.

Atenciosamente,



Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR

Comissão de Ética Médica – HUEC.

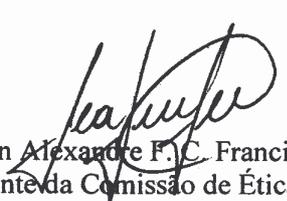
Serviço de Queimados do HUEC

A comissão de Ética Médica do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba em reunião ordinária analisou projeto de pesquisa intitulado **“CORRELAÇÕES DO ESTUDO HISTOPATOLÓGICO E CULTURA SEMIQUANTITATIVA DE BIOPSIA NO DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO DA FERIDA QUEIMADA”**.

Considerou que não se trata de experimentação em seres humanos não estando portanto sob os ditames de resolução 196/96 do Conselho Nacional de Pesquisa.

Concluiu que o protocolo preenche as disposições dos artigos 123 e 127 do Código de Ética Médica e as demais orientações do Capítulo XII referentes a pesquisa médica.

Curitiba, 19 de agosto de 2004.



Dr. Jean Alexandre F. C. Francisco
Presidente da Comissão de Ética
Médica - HUEC.

ANEXO III

FICHA CLÍNICA E LABORATORIAL

PESQUISA ACADÊMICA
**PROTOCOLO DOS DADOS CLÍNICOS – 48H APÓS A
 COLETA DE BIÓPSIA**

Cole aqui a etiqueta de internamento

Dia da Coleta da Biópsia: _____

Cor: B - N - A

Renda Familiar: 1 a 3 SM; 4 a 6 SM; 7 a 10 SM; acima 10 SM

Grau de Escolaridade: 1º Grau; 2º Grau; 3º Grau

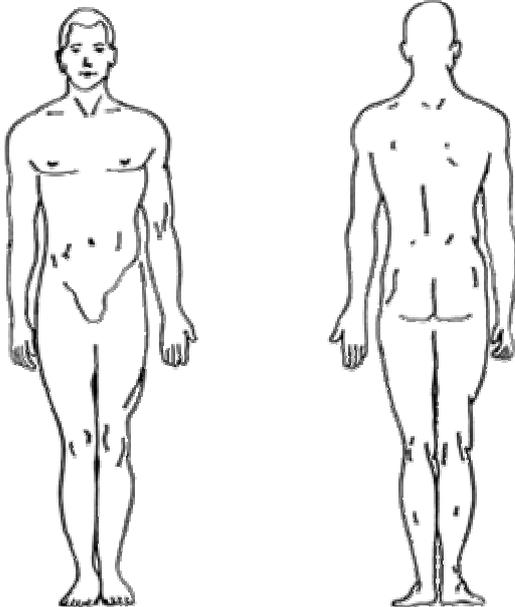
Dia do Acidente : ____ / ____ /2005- ____ Internação : ____ / ____ /2005

Agente: álcool; - água quente; - leite; - chá; - eletricidade; - fogo; - café; - óleo de cozinha; - outro : _____

Primeiros cuidados: não - sim . O que? _____

Local: . residência; local de trabalho; fora da residência

. outro : _____



Área Queimada: _____ % (Tab L&B)

Profundidade: I G ; II G Sup; II G Prof; III G

Pinte os locais comprometidos!

Complicações:

	Pneumonia	SEPSIS	Secreção em área queimada	Febre
Sim				
Não				

Exames Laboratoriais:

Data	Hb	Leuc	Plaq	Alb

Dados Laboratório

Data: _____ Número de registro: _____

Peso do tecido: _____ gramas.

Microorganismos: _____ UFCs: _____

Anti: _____

Swab: _____

ANEXO IV

FICHA DO HISTOPATOLÓGICO E COLORAÇÃO DE GRAM PARA TECIDO

Cole aqui a etiqueta de internamento

PACIENTE

Sexo : M - F

Idade : _____;

Residência : Ctba ___ Reg. Metropol. ___ Outras cidades do PR ___ Outro estado ___

Médico: _____;

FERIMENTO

Dia do Acidente: _____ / _____ /20__

Agente => álcool ___ água quente ___; leite ___ chá ___ eletricidade ___ fogo ___ café ___ óleo de cozinha ___ outro: _____.

Primeiros cuidados : não - sim . O que? _____

Local : . residência ___ fora da residência ___ cozinha ___ quintal ___ quarto ___ garagem ___ na rua ___;
 . outro : _____

Dia do Internamento: _____ / _____ /20__

ESTADO NA ENTRADA

Área queimada : _____ % (Tabela de Lund & Browder)

Locais comprometidos :

cabeça; couro cabeludo; face; nariz; boca; pescoço; orelha; olhos;
 tronco anterior; abdome; genitais; tronco posterior; reg.glútea;
 MSD; MSE; mão; antebraço; braço ; - MID; MIE; pé; perna; coxa ; . outros _____

HISTOPATOLOGICO - RESULTADO

ULCERAÇÃO:

Total – sem epiderme
 Parcial – com parte da epiderme

NECROSE: Coagulativa e Supurativa

Discreta – derme superficial
 Moderada – derme intermediária
 Severa – derme profunda

INFLAMAÇÃO:

Crônica / Reparativa:
 Discreta
 Moderada
 Acentuada

MICROORGANISMOS:

Localização:
 Na superfície; No interior do derme superficial; No interior do derme Intermediário; No interior do derme profundo e No interior da hipoderme.

Distribuição:
 Tecido Viável e Não Viável.

GRAM MODIFICADO PARA TECIDO BROW AND BRENN

FIXAÇÃO: formalina a 10%.

CORTES: parafina, 6 µm.

SOLUÇÕES:

- 1% Solução de Cristal Violeta
- 5% Solução de Bicarbonato de Sódio
- Solução Iodine de Gram
- 0,25% Solução Estoque de Fucsian Básica

Solução de Fuccina Básica de Trabalho

Fuccina básica, estoque.....	10,0 ml
Água destilada.....	90,0 ml

Solução Ácido Pítrico em Acetona

Ácido Pítrico.....	0,1 g
Acetona.....	100,0 ml

Solução Xilol-Acetona

Acetona.....	50,0 ml
Xilol.....	50,0 ml

PROCEDIMENTO:

1. Desparafinar e hidratar com água destilada.
2. Com a lâmina na horizontal, adicionar 20gotas de solução aquosa de cristal violeta e 5 gotas de solução de bicarbonato de sódio a 5% por 1 minuto. Agitar gentilmente.
3. Enxaguar em água de torneira.
4. Colocar solução de iodine de Gram por 1 minuto.
5. Enxaguar em água de torneira.
6. Descorar com acetona.
7. Enxaguar em água de torneira.
8. Cobrir com a solução trabalho de fuccina básica, por um minuto. Enxaguar.
9. Mergulhar rapidamente na acetona.
10. Diferenciar rapidamente cada lâmina com solução de ácido pítrico em acetona até os cortes ficarem cor-de-rosa amarelado.
11. Lavar rapidamente em acetona, então em solução xilol-acetona.
12. Xilol e montar com meio resinoso.

RESULTADOS

Bactéria gram-positiva.....	Azul
Bactéria gram-negativa.....	Vermelho
Filamentos de Nocardia e Actinomyces.....	Azul
Núcleos.....	Vermelho
Outros elementos teciduais.....	Amarelo

REFERÊNCIA

BROW J.H.; BRENN L. Bulletin Johns Hospital. 1931; 48:69

ANEXO V**FÓRMULAS DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NAS PROVAS DE
IDENTIFICAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE**

1. PROVA: REDUÇÃO DE NITRATO

1.1 Composição do Meio:

- | | |
|--|---------------|
| • Extrato de carne | 3,0g |
| • Peptona | 5,0g |
| • Nitrato de potássio, KNO ₃ , 0,1% | 1,0g |
| • Água deionizada | q.s.p. 1000mL |

pH do caldo nitrato 7,0 ± 0,2

1.2 Preparo:

Pesar as quantidades especificadas na fórmula, rehidratar com água deionizada. Ajustar o pH conforme instrução do fabricante. Colocar 3,0 mL em cada tubo (13x100mm) e um tubinho de Durham. Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

1.3 Controle de Qualidade:

Escherichia coli ATCC® 25922, nitrato positivo, gás negativo

Acinetobacter baumannii ATCC® 19606, nitrato negativo
e/ou

Positivo (+): *E. Coli* ATCC® 11775

P. aeruginosa ATCC® 10145

NO₃ +/ Gás +

Negativo (-): *A. Iwoffii* ATCC® 15309

NO₃ -/ Gás -

2. PROVA: CITRATO (SIMMONS)

2.1 Composição do Meio:

- | | |
|-----------------------------|-----------|
| • Fosfato diácido de amônio | 1,0g |
| • Fosfato dipotássico | 1,0g |
| • Cloreto de Sódio | 5,0g |
| • Citrato de Sódio | 2,0 |
| • Sulfato de Magnésio | 0,20g |
| • Ágar | 15,0g |
| • Azul-de-bromotimol | 0,08g |
| • Água destilada q.s.p. | 1000,0 ml |

pH 6,9 ± 0,2

2.2 Preparo:

Pesar as quantidades especificadas na fórmula, rehidratar com água deionizada. Ajustar o pH conforme instrução do fabricante. Distribuir 4ml em tubos com tampas. Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

2.3 Controle de Qualidade:

Positivo (+): *Proteus rettgeri* ATCC® 13315

K. pneumoniae ATCC® 13883

Enterobacter cloacae ATCC® 13047

Negativo (-): *E. coli* ATCC® 11752

Shigella flexneri ATCC® 12022

3. PROVA: HIDRÓLISE DA ESCULINA

3.1 Composição do Meio:

Ágar Esculina Modificado:

- | | |
|---------------------------|-----------|
| • Esculina | 1,0g |
| • Citrato férrico | 0,5g |
| • Ágar infusão de coração | 40,0g |
| • Água destilada q.s.p. | 1000,0 ml |

Caldo Esculina:

- | | |
|-------------------------------|-------|
| • Infusão de músculo cardíaco | 10,0g |
|-------------------------------|-------|

- Digerido péptico de tecido animal 10,0g
- Cloreto de Sódio 5,0g
- Esculina 1,0g
- Água destilada q.s.p. 1000,0 ml

pH 7,1 ± 0,2

3.2 Preparo:

Pesar as quantidades especificadas na fórmula, rehidratar com água deionizada. Ajustar o pH. Distribuir 4ml em tubos com tampas. Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

3.3 Controle de Qualidade:

Positivo (+): *Aeromonas hydrophila* ATCC® 7965

Negativo (-): *P. aeruginosa* ATCC® 19615

4. PROVA: LIQUEFAÇÃO DA GELATINA

4.1 Composição do Meio:

- Extrato de carne 3,0g
- Peptona 5,0g
- Gelatina, 12% 120,0g
- Água deionizada 1000,0 ml

pH 6,8 ± 0,2

4.2 Preparo:

1. Primeiro adicione somente gelatina à água deionizada e reserve por 15-30min

2. Aqueça a 50°C para dissolver a gelatina

3. Adicione extrato de carne e peptona e novamente aqueça a 50°C, para dissolver todos os componentes.

4. Não sobreaqueça

Esterilizar a 121 °C por 15 minutos. Esfriar em banho-maria até 50°C.

4.3 Controle de Qualidade:

Positivo (+): Crescimento e liquefação

P. vulgaris ATCC® 8427

Serratia proteamaculans ATCC® 19323

Negativo (-): Crescimento e não liquefação

E. Coli ATCC® 25922

5. PROVA: TESTE DO MALONATO

5.1 Composição do Meio:

- Extrato de levedura 1,0g
- Sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄ 2,0g
- Fosfato dipotássio K₂HPO₄ 0,6g
- Fosfato monopotássio KH₂PO₄ 0,4g
- Cloreto de Sódio NaCl 2,0g
- Malonato de Sódio 3,0g
- Glicose (dextrose) 0,25g
- Azul de Bromotimol (BTB) 0,025g
- Água deionizada 1000 ml

Indicador de pH: azul de bromotimol (BTB)

- Ácido: amarelo, pH 6,0
- Alcalino: azul da Prússia, pH 7,6
- Meio sem inóculo: pH 6,7, verde

5.2 Preparo:

Pese os ingredientes. Rehidratar com água deionizada ou destilada. Aquecer pouco a solução. Dispensar aproximadamente 3,0 ml por tubo com tampa. Autoclavar por 15 min. a 120 °C. Deixar esfriar antes de usar. Pode ser guardado por até 3 meses, sob temperatura 4-10 °C.

5.3 Controle de Qualidade:

Positivo (+): *E. aerogenes* ATCC® 13048; *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC® 13883
 Negativo (-): *E. coli* ATCC® 25922

6. PROVA: TESTE DE MOTILIDADE

6.1 Composição do Meio:

- | | |
|--------------------|---------|
| • Extrato de carne | 3,0g |
| • Cloreto de Sódio | 10,0g |
| • Ágar | 4,0g |
| • Água destilada | 1000 ml |

pH 7,3; fórmula de Edwards e Ewing:

6.2 Preparo:

Pese os ingredientes. Rehidratar com água destilada ou desmineralizada. Aquecer pouco a solução. Dispensar aprox. 5,0 ml por tubo. Autoclave por 15 min., 120 °C. Deixar o meio resfriar em posição vertical, armazene em temp. 4-10 °C.

6.3 Controle de Qualidade:

Positivo (+): *E. coli* ATCC® 25922; *Clostridium sporogenes* ATCC® 11437
 Negativo (-): *S. aureus* subsp. *aureus* ATCC® 25923

7. PROVA: TESTE DE OXIDAÇÃO - FERMENTAÇÃO

7.1 Composição do Meio:

Meio basal OF de Hugh e Leifson:

Ingredientes do meio semi-sólido, pH 7,1:

- Peptona caseína (triptona) 0,2% 2,0g
- Cloreto de sódio NaCl 5,0g
- Fosfato dipotássio (K₂HPO₄) 0,3g
- Ágar 2,0 – 3,0g
- Azul de bromotimol (BTB) 0,03-0,08g
- Água deionizada 1000 ml

Indicador de pH: azul de bromotimol (BTB):

- Ácido: amarelo, pH 6,0
- Alcalino: azul da Prússia, pH 7,6
- Meio sem inóculo: verde, pH 7,1

7.2 Preparo:

Pesar os ingredientes. Rehidratar com água destilada ou desmineralizada. Aquecer pouco a solução. Autoclavar por 15 min., 121 °C. Resfriar o meio base em banho-maria 40-45 °C. A adição do carboidrato pode ser depois de autoclavar o meio base, solução aquosa 10% (10g/100ml), deve ser filtrado em membrana Millipore (diâmetro 0,45 µm). Ou adiciona-se o carboidrato (1% carboidrato desidratado, 10g/l) ao meio base antes de ser esterilizado (autoclave 10 min., 118°C). Se o carboidrato é adicionado ao meio base antes de ser autoclavado, a temperatura pode causar a quebra do carboidrato. Entretanto, Hugh e Leifson afirmam que o carboidrato pode ser autoclavado se uma solução aquosa a 10% for usada. A uma alíquota de 100 ml de meio base é adicionado 10 ml de uma solução aquosa de carboidrato estéril (filtrado), concentração final do carboidrato: 1%. Dispensar asepticamente aproximadamente 5,0 ml por tubo com tampa. Resfriar antes de usar e armazenar (4-10°C).

7.3 Controle de Qualidade:

Fermentador – *E. coli* ATCC® 25922 ou *K. pneumoniae* ATCC 13883

Oxidativo – *P. aeruginosa* ATCC® 27853

8. PROVA: TESTE DA FENILALANINA DESAMINASE

8.1 Composição do Meio:

• DL-fenilalanina	2,0g
• Extrato de levedura	3,0 g
• Cloreto de Sódio	5,0g
• Fosfato disódio (Na ₂ HPO ₄)	1,0 g
• Ágar	12,0g
• Água deionizada	1000 ml

pH 7,3 ± 0,2

8.2 Preparo:

Pesar os ingredientes. Rehidratar com água destilada ou desmineralizada. Aquecer pouco a solução. Dispensar aproximadamente 4,0 ml por tubo. Autoclavar por 15 min, 121°C. Deixar o meio solidificar em posição inclinada. Resfriar antes de usar e armazenar a 4-10°C.

Dissolver o componente da fórmula em água deionizada, conforme a quantidade de meio que se deseja produzir. Hidratar por 10-15 minutos. Aquecer agitando freqüentemente e ferver até completa dissolução do ágar. Esfriar o meio até que esteja à temperatura aproximada de 55°C. Com auxílio do pipetador automático, distribuir o meio nos tubos com um volume de aproximadamente 4 mL, tampar e colocar os tubos em um cesto de metal, identificando-o. Esterilizar a 121 °C por 20 minutos, por autoclavagem. Retirar do autoclave, e, com auxílio de estantes próprias, inclinar os tubos com aproximadamente 1,0 cm de pico.

OBS: Se for usada L-fenilalanina, pesar apenas 1,0g.

8.3 Controle de Qualidade:

Crescimento negativo (-): *Escherichia coli* ATCC® 25922

Crescimento positivo (+): *P. mirabilis* ATCC® 12453

9. PROVA: Testes de Descarboxilase (LISINA, ORNITINA) e de Dehidrolase (ARGININA)

9.1 Composição do Meio:

• Peptona (pepsin)	5,0 g
• Extrato de carne	5,0 g
• Púrpura de Bromocresol	0,1 g
• Cresol vermelho	0,005 g
• Piridoxal fosfato	0,005g
• Glicose (dextrose)	0,5g
• Água deionizada	1000,0 ml

pH do meio: 6,0 ± 0,2

Indicador de pH:

- Púrpura de bromocresol: ácido: amarelo, pH 5,2; alcalino: purple, pH 6,8.
- Cresol vermelho (alcalino): alcalino: amarelo, pH 7,2; alcalino: vermelho, pH 8,3.
- Meio sem inóculo: pH 6,0, brilhante purple.

9.2 Preparo:

Pesar os ingredientes. Rehidratar com água destilada ou desmineralizada. Aquecer pouco a solução. Adicionar 10 g (concentração 1%) do aminoácido desejado: 1% L-(+)-lisina dicloridrato, 1% L-(+)-ornitina dicloridrato; 1% L-(+)-arginina monocloridrato. Distribuir 4mL em cada frasco (13x100mm) e autoclavar a 121°C por 15 minutos.

9.3 Controle de Qualidade:

Lisina: Positivo (+) - *Klebsiella penumoniae* subsp. *Pneumoniae* ATCC® 10031

Negativo (-) - *Enterobacter cloacae* ATCC® 13047

Arginina: Positivo (+) - *Enterobacter cloacae* ATCC® 13047

Negativo (-) - *Klebsiella penumoniae* subsp. *Pneumoniae* ATCC® 10031

Ornitina: Positivo (+) - *Enterobacter cloacae* ATCC® 13047

Negativo (-) - *Klebsiella penumoniae* subsp. *Pneumoniae* ATCC® 10031

10. PROVA: PROVA DA PIOCIANINA – PSEUDO P

10.1 Composição do Meio:

• Peptona de gelatina	20g
• Cloreto de Magnésio	1,4
• Sulfato de Potássio	10g
• Ágar-ágar	15g
• Água q.s.p.	1000,0 ml

pH 7,0 ± 0,2

10.2 Preparo:

Pesar 46,4 g e diluir em um litro de água destilada, acertar o pH, acrescentar 10 ml de glicerol, aquecer até completa dissolução. Distribuir em tubos gordos de rosca, esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

10.3 Controle de Qualidade:

Positivo (+): *P. aeruginosa* ATCC® 27853

Negativo (-): *A. baumannii* 1129 Newprov®

11. PROVA: PROVA DA PIOVERDINA (Fluoresceína) – PSEUDO F

11.1 Composição do Meio:

• Peptona de caseína	10g
• Peptona de carne	10g
• Sulfato de Magnésio	1,5g
• Fosfato dipotássico	1,5g
• Ágar-ágar	12g
• Água q.s.p.	1000,0 ml

pH 7,0 ± 0,2

11.2 Preparo:

Pesar todos os ingredientes e diluir em 1000 ml de água destilada, acertar o pH, adicionar 10 ml de glicerol. Ferver até completa dissolução dos reagentes e distribuir em tubos gordos, quase a metade do tubo. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos, solidificar os tubos inclinados.

11.3 Controle de Qualidade:

Positivo (+): *P. aeruginosa* ATCC® 27853

Negativo (-): *A. baumannii* 1129 Newprov®

12. PROVA: CRESCIMENTO EM ÁGAR CETRIMIDE

12.1 Composição do Meio:

• Peptona	20g
• Cloreto de Magnésio	1,4g
• Sulfato de Potássio	10g
• Cetrimide	0,3g
• Ágar	13,6g
• Água q.s.p.	1000,0 ml

pH 7,2 ± 0,2

12.2 Preparo:

Pesar o ágar cetrimide, acrescentar a água mais o glicerol e aquecer o suficiente para dissolver. Distribuir 4 ml em tubo de 12x120 mm temo-resistente, com tampas de rosquear. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos, solidificar os tubos inclinados.

12.3 Controle de Qualidade:

Positivo (+): *P. aeruginosa* ATCC® 27853 – crescimento a 33°C e 42 °C

Negativo (-): *E.coli* ATCC® 25922 – ausência de crescimento em ambas as temperaturas

13. PROVA: ACETAMIDA

13.1 Composição do Meio:

Ágar Acetamida

• Cloreto de Sódio	5,0g
• Sulfato de Magnésio	0,2g
• Fosfato de Amônia, monobásico	1,0g
• Fosfato de Potássio, dibásico	1,0g
• Acetamida	10,0g
• Ágar	15g
• Azul de Brotimol	0,08g
• Água q.s.p.	1000,0 ml

pH 6,8 ± 0,2

Caldo Acetamida:

• Cloreto de Sódio	5,0g
• Sulfato de Magnésio	0,5g
• Fosfato de Potássio, dibásico	0,365g
• Acetamida	10,0g
• Vermelho de Fenol	0,012g
• Água q.s.p.	500,0 ml

pH 7,0 ± 0,2

13.2 Preparo:

Pesar as quantidades especificadas na fórmula, rehidratar com água deionizada. Ajustar o pH. Distribuir aproximadamente 5ml em tubos com tampas, solidificar os tubos inclinados. Autoclavar a 121°C por 15 minutos. Armazenar em temperatura de 2-8 °C

13.3 Controle de Qualidade:

Positivo (+): *P. aeruginosa* ATCC® 27853 – crescimento e cor azul

Negativo (-): *E. coli* ATCC® 25922 – não crescimento e cor verde

14. PROVA: FERMENTAÇÃO DO MANITOL

14.1 Composição do Meio:

• Proteose Peptona (digesto pancreático de caseína)	10g
• Vermelho de fenol	0,018
• Ágar	15,0g
• D-Manitol	10g
• Água deionizada	1000mL
• Cloreto de sódio	5g

pH: 7,5 ± 0,2

14.2 Preparo:

Aquecer gentilmente até dissolver. Colocar em agitador magnético com aquecimento, mantendo temperatura baixa. Adicionar um magneto ao frasco e manter o meio em constante agitação, durante a distribuição nos tubos (8,0mL) sem inclinar. Autoclavar a 116-118°C, 10-12 lb, 15 minutos.

14.3 Controle de Qualidade:

Positivo (+): *S. aureus* subsp. *aureus* ATCC® 25923

Negativo (-): *Staphylococcus epidermidis* ATCC® 12228

15. PROVA: DNASE

15.1 Composição do Meio:

- | | |
|---|-----------|
| • Ácido desoxirribonucléico (DNA), 0,2% | 2,0g |
| • Bacto - Triptose | 20,0g |
| • Cloreto de sódio, NaCl | 5,0g |
| • Ágar, 1,5% | 15,0g |
| • Água deionizada | 1000,0 ml |

pH 7.3 ± 0.2

15.2 Preparo:

Dissolver 42 g de Ágar DNASE desidratado em 1 litro de água destilada. Hidratar por 10-15 minutos e ajustar o pH p/ 7,3a 25°C. Aquecer agitando freqüentemente e ferver por 1 minuto. Esterilizar a 121 °C por 15 minutos. Esfriar em banho-maria até 50°C. Distribuir 15-20 mL por placa de Petri. Identificar as placas individualmente com o nome do meio. Logo após solidificar, inverter as placas.

15.3 Controle de Qualidade:

Positivo (+): *S. aureus* subsp. *aureus* ATCC® 25923*S. pyogenes* ATCC® 19615Negativo (-): *S. epidermidis* ATCC® 12228**16. PROVA: HEMÓLISE**

16.1 Composição do Meio:

- Columbia Ágar Base
- 5% de sangue de coelho (para α hemólise)
- 5% de sangue de carneiro (para β hemólise)

16.2 Preparo:

Preparar o Columbia Ágar Base segundo orientações do fabricante. Deixar atingir a temperatura de 45°C-50°C e adicionar 5% de sangue de coelho ou 5% de sangue de carneiro. Homogeneizar bem e distribuir em placas de 90x15mm.

16.3 Controle de Qualidade:

Positivo (+): *Staphylococcus haemolyticus* ATCC® 29970, positiva para β hemóliseNegativo (-): *Staphylococcus saprophyticus* ATCC® 15305, negativa para hemólise.**17. PROVA: CHAPMAN**

17.1 Composição do Meio:

- | | |
|--------------------|---------|
| • TSB | 30g |
| • Ágar | 17g |
| • Cloreto de Sódio | 70g |
| • Água destilada | 1000 ml |

pH 7.0 ± 0.2

17.2 Preparo:

Dissolver os componentes da fórmula em água destilada conforme a quantidade de meio que se deseja produzir. Hidratar por 10-15 minutos. Aquecer agitando freqüentemente e ferver até completa dissolução do ágar. Com auxílio do pipetador automático, distribuir o meio nos tubos com um volume de aproximadamente 3 mL, tampar e colocar os tubos em um cesto de metal, identificando-o. Esterilizar a 121 °C por 20 minutos, por autoclavação. Retirar do autoclave, e, com auxílio de estantes próprias, inclinar os tubos com aproximadamente 1,0 cm de pico.

17.3 Controle de Qualidade:

Positivo (+): *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923*Staphylococcus epidermidis* ATCC® 12228Negativo (-): *Escherichia coli* ATCC® 25922

18. PROVA: GEN *mecA*

18.1 Composição do Meio:

- | | |
|-----------------------|---------|
| • Ágar MUELLER-HINTON | 3,8g |
| • Cloreto de Sódio | 4,0,0g |
| • Água deionizada | 1000 ml |

Solução de oxacilina 60 mg% p/v:

- | | |
|------------------------------|---------|
| • Pesar 0,0661g de oxacilina | |
| • Água deionizada | 1000 ml |

18.2 Preparo:

Pesar os componentes da fórmula e diluir em 100 ml de água destilada ou deionizada. Aquecer até fervura para dissolução do ágar, ajustar o pH conforme indicação do ágar Mueller-Hinton, esterilizar por 15 min a 120°C, resfriar a $\pm 50^\circ\text{C}$ e adicionar a oxacilina sódica, já preparada (congelada no freezer). Distribuir em placas 120x20 ou placas médias (90 mm), conservar a $\pm 4^\circ\text{C}$.

18.3 Controle de Qualidade:

Positivo (+): *S. aureus* ATCC® 38591 (Oxacilina R)

Negativo (-): *S. aureus* ATCC® 25923 (Oxacilina S)

19. PROVA: SCREENING PARA VISA/VRSA

19.1 Composição do Meio:

- | | |
|-----------------------|---------|
| • Ágar MUELLER-HINTON | 3,8g |
| • Cloreto de Sódio | 4,0,0g |
| • Água deionizada | 1000 ml |

Solução de oxacilina 60 mg% p/v:

- | | |
|------------------------------|---------|
| • Pesar 0,0661g de oxacilina | |
| • Água deionizada | 1000 ml |

19.2 Preparo:

Pesar os componentes da fórmula e diluir em 100 ml de água destilada ou deionizada. Aquecer até fervura para dissolução do ágar, ajustar o pH conforme indicação do ágar Mueller-Hinton, esterilizar por 20 min a 120°C, resfriar a $\pm 50^\circ\text{C}$ e adicionar 100 ml de cloridrato de vancomicina 370 mg%, já preparada (congelada no freezer), distribuir em placas médias (90 mm), conservar a $\pm 4^\circ\text{C}$, sem deixar na estufa. Concentração final: 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

19.3 Controle de Qualidade:

Positivo (+): *E. faecalis* ATCC® 51299 (Vancomicina R)

Negativo (-): *S. aureus* ATCC® 25923 (Vancomicina S)

ANEXO VI

PROTOCOLOS DE COLETA, DA CULTURA E DO HISTOPATOLÓGICO

PROTOCOLO

COLETA DE BIÓPSIA COM “PUNCH” PARA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA EM PACIENTES QUEIMADOS.

A) Método de coleta de biópsia por "punch"

O "*punch*" é amplamente utilizado como instrumento para realização de biópsia cutânea, o qual é constituído por uma lâmina circular na extremidade de um tubo que permite a remoção de um cilindro composto por epiderme, derme e pequena porção de hipoderme.

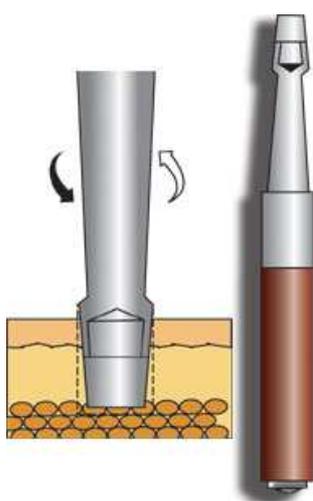
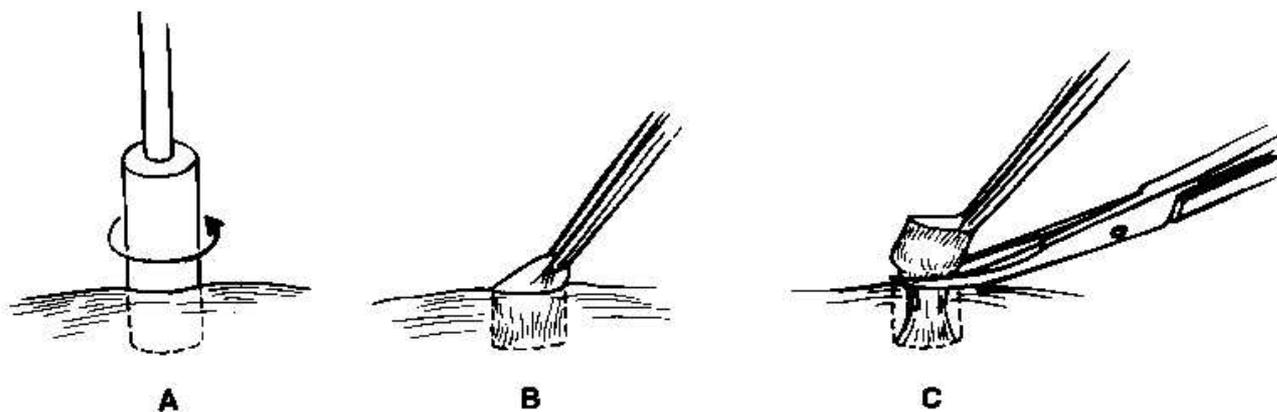
Ao fazer biópsias por "punch" deve-se colher apenas fragmentos da lesão a ser examinada, ou seja, evite realizar a biópsia da transição lesão/tecido aparentemente normal; os fragmentos devem, portanto, representar apenas a lesão.

No CCQ (Centro Cirúrgico de Queimados), o paciente será admitido dentro da rotina dos curativos;

- 1) o procedimento anestésico (anestesia geral) não sofrerá mudança;
- 2) todas as ataduras serão retiradas como de rotina;
- 3) ainda proceder-se-á a coleta de *swab* das áreas que apresentem secreção, como de rotina;
- 4) após assepsia das áreas queimadas, com uso de Cloreto de Sódio a 0,9%, a área a ser retirada a amostra para a análise microbiológica e histológica deverá estar limpa e seca;
- 5) será escolhida a área a ser retirados os dois fragmentos de tecido, da escara necrótica que se apresentar com aspecto, coloração e cheiro compatíveis com processo infeccioso e/ou crescimento bacteriano, conforme a experiência clínica dos profissionais diretamente envolvidos no tratamento clínico e cirúrgico do paciente;
- 6) introduzir a lâmina do "*punch*" perpendicularmente à pele (com o eixo desse instrumento posicionado a 90° em relação ao plano da superfície cutânea);
- 7) como a análise será microbiológica e histológica, recomenda-se manter corte de tecido com o "*punch*" em um sentido único, podendo-se realizar movimentos rotativos;
- 8) após atingir a marca-limite de corte em profundidade, a rotação do "*punch*" deverá limitar a área inferior, para que a amostra de tecido possa ser incisada pela própria lâmina deste, com a inclinação do cabo para um ângulo de 30-45° ou com o uso de uma tesoura curva ou bisturi e o auxílio de uma pinça anatômica previamente estéril;
- 9) colocar a primeira amostra do tecido removido IMEDIATAMENTE no frasco contendo Cloreto de Sódio a 0,9 %, e em seguida colher a segunda amostra e colocá-la de imediato em solução de formalina a 10%.
- 10) deve-se atentar para possíveis contaminações na coleta do material para análise microbiológica;

- 11) o encaminhamento do material, para análise microbiológica, deverá ocorrer de imediato ao laboratório (setor de microbiologia), ou a sua preservação deverá ser em ambiente refrigerado e com temperatura nunca superior a 4°C. A amostra destinada a histopatologia deverá ser identificada e enviada ao Dpto. de Patologia Básica, para posterior processamento.
- 12) Em geral não há necessidade de sutura, porém o cirurgião deverá avaliar tal condição no ato da intervenção.

Elaborado por Jannaina F. Melo Vasco



©1994 Jeffrey L. Melton

PROTOCOLO

CULTURA SEMIQUANTITATIVA DE BIÓPSIA COM “PUNCH” EM PACIENTES QUEIMADOS.

Amostras de tecido (biópsias), obtidas utilizando-se um “punch” de tamanho pré-determinado (4mm) de cor azul, metodologia proposta por Buchaman (1986).

A) Requisição:

- Será encaminhado ao laboratório um pedido médico de cultura semiquantitativa de biópsia e cultura de secreção de queimados (*swab*), que serão registrados no sistema;
- As amostras vindas do Centro Cirúrgico de Queimados (CCQ) serão etiquetadas com número de cadastro interno do laboratório e encaminhadas ao setor de microbiologia.

B) Processamento da amostra:

- ao chegar ao laboratório a amostra será pesada em balança de precisão e seu peso será anotado em gramas (g);
- posteriormente será macerada em trituradores com 2 ml de solução fisiológica;
- são inoculados 0,1 e 0,01 ml, com auxílio de pipetas Eppendorfs, em Ágar Sangue e MacConkey (em duplicata,) incubados a $35 \pm 2^\circ \text{C}$, por 24 ou 48 horas;
- para a contagem das colônias são utilizadas as placas que contenham entre 15-300 UFCs;
- o cálculo é realizado por meio da fórmula:

$$\frac{N \times V \times v}{W}$$

Onde:

N = número de UFCs contados na placa;

V = volume de inóculo utilizado (0,1 ou 0,01 ml);

v = volume de diluente utilizado no homogeneizado;

W = peso do tecido.

- nas placas com contagem superior a 300 é utilizado N=300, e o resultado é considerado como maior (>) que o valor obtido;
- resultados acima de 10^5 UFC/g são considerados infecção e seguirão para identificação do(s) agente(s) etiológico(s) e antibiograma;

- resultados abaixo deste valor serão considerados colonização e seguirão apenas para identificação.

C) Lavagem do material:

- os trituradores devem ser, primeiramente, mergulhados em solução de água e hipoclorito de sódio, por aproximadamente 10 a 15 minutos;
- posteriormente, devem ser colocados em preparação enzimática “Endozime AW PLUS” diluído (1l de água para 4ml de Sol. Enzimática) por 2 minutos. Deve-se enxaguar com água abundantemente;
- depois de lavados os trituradores são encaminhados, mediante um pedido de esterilização, para a central de esterilização;
- são esterilizados em Ciclo de Formoldeído por 15 minutos.
- os “*punch*” são descartáveis, devendo ser utilizados apenas uma única vez.

PROTOCOLO

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE BIÓPSIA COM “PUNCH” EM PACIENTES QUEIMADOS.

Amostras de tecido (biópsias) de pele queimada, obtidas utilizando um “punch” de tamanho pré-determinado (4mm) de cor azul.

D) Processamento da amostra:

- Amostras colhidas no Centro Cirúrgico de Queimados (CCQ) por “punch” serão imediatamente fixadas em solução de formalina a 10%;
- Uma vez fixada será desidratada automaticamente, passando em soluções de concentração crescente de álcoois (70°-80°-90° e absoluto) e posteriormente diafanizadas em xilol;
- A biópsia será incluída em parafina, o que permitirá a realização de cortes de 3 a 5 µm em micrótomo com navalhas descartáveis, perpendiculares à superfície cutânea;
- Os cortes serão desparafinados e hidratados com álcool absoluto, 90°, 80°, 70°. A lâmina é colocada na cuba histológica com H₂O por 10-15 minutos;
- Posteriormente os cortes serão corados pela hematoxilina-eosina (HE) (para diferenciação de tecido normal e queimado) e pelo Gram (para evidenciar a presença de bactérias e classificá-las em gram-positivas e gram-negativas), podendo conforme necessidade ser utilizadas: técnica de coloração como PAS, Grocott, Tricrômico, entre outras.
- Para a montagem da lâmina será colocado bálsamo do Canadá sobre o corte e colocada a lamínula sobre a lâmina.

O espécime histológico será examinado por microscópio óptico (aumento de 400 e 1000 vezes).
O alcance da profundidade da invasão bacteriana será classificado pela seguinte escala:

ULCERAÇÃO:

Total – sem epiderme
Parcial – com parte da epiderme

NECROSE: Coagulativa e Supurativa

Discreta – derme superficial
Moderada – derme intermediária
Severa – derme profunda

INFLAMAÇÃO:

Crônica / Reparativa:
Discreta
Moderada
Acentuada

MICROORGANISMOS:

Localização:
Na superfície; No interior do derme superficial; No interior do derme Intermediário; No interior do derme profundo e No interior da hipoderme.
Distribuição:
Tecido Viável e Não Viável.

Visualização de microrganismos em tecido viável representa infecção invasiva da ferida por queimadura.