

Artigo original**Estudo microbiológico *in vitro* do crescimento bacteriano após aplicação do laser HeNe em úlceras de decúbito com infecção bacteriana*****Microbiological study in vitro of the bacterial growth after application of the HeNe laser in ulcers of decubitus with bacterial infection***

Paulo de Tarso C. Carvalho*, Rodrigo Renato Silva**, Reginaldo J. Silva***

.....

* *Fisioterapeuta Mestrando em Bioengenharia EESC/FMRP/IQSC-USP/SP, Docente do Curso de Fisioterapia - UNIDERP/MS; ** Fisioterapeuta Docente do Departamento de Fisioterapia - UNIBAN/ SP; *** Fisioterapeuta Especialista em Fisioterapia Desportiva - Andradina/SP*

Resumo

Objetivo: Este estudo foi conduzido com o objetivo de verificar as alterações provocadas pela irradiação laser em culturas bacterianas *in vitro*. *Materiais e Métodos:* Foram coletadas amostras provenientes de úlceras de decúbitos infectadas. O material clínico foi semeado em tubos de ensaio contendo meio de cultura líquido -TSB - e em placas de Petri com meio ágar enriquecido-TSA. Ambas as amostras foram submetidas à radiação laser com 4 joules cm². Todas as amostras foram incubadas em estufa bacteriológica. Após este período, foi realizada a contagem de bactérias em placas pelo método de diluição. Este processo foi realizado por dez dias consecutivos. Foram efetuadas duas coletas distintas de material clínico para estudo no decorrer da pesquisa. Paralelamente eram realizados esfregaços das colônias crescidas em ágar e coloridas pelo método de Gram, para identificação morfotintorial. *Resultados:* Ao final do

Palavras-chave:

Fisioterapia, laser de baixa intensidade, úlcera de decúbito, úlcera infectada

Endereço para Correspondência:

Prof. Paulo de Tarso C. Carvalho, Departamento de Fisioterapia UNIDERP, Av. Alexandre Herculano, 4000, Bairro Parque dos Poderes - 79037-280, Campo Grande - MS, Tel: (67) 726 3676, E-mail: ptpaulo@enersulnet.com.br

estudo observou-se redução média de aproximadamente 48% do crescimento bacteriano das culturas submetidas à radiação laser em relação ao grupo. *Conclusão:* Após os exames microbiológicos *in vitro* concluiu-se que as amostras submetidas à radiação laser apresentaram crescimento bacteriano menor que o grupo controle.

Abstract

Objective: This study bacterianas In was lead with the objective to verify the alterations provoked for the laser irradiation *in vitro* cultures. *Materials and Methods:* Samples had been collected from infected decubitus ulcers. The clinical material was sown in assay tubes contends half of liquid culture - TSB - and in Petri dishes with half enriched-TSA agar. Both the samples had been submitted to the laser radiation with 4 joules/cm². All the samples had been in incubation in bacteriological environment. After this period, was realized the bacteria numeration in dishes by dilution method. This process was carried through per ten days. Has effected two distinct collections of clinical material during the study. In parallel the colonies grown in agar were scratched and tinted by the method of Gram, for identification. *Results:* To the end of the study average reduction of 48% of the bacterial growth of the cultures submitted to the laser radiation in relation to the group was observed approximately. *Conclusion:* After the microbiological examinations *in vitro* concluded that the samples submitted to the laser radiation had presented lesser bacterial growth that the group has controlled..

Key-words:

Physiotherapy,
Laser HeNe,
Infected Ulcer,
Decubitus Ulcer

.....

Introdução

Úlceras de decúbito, escaras do leito, escaras por pressão e úlceras por pressão são simplesmente nomes diferentes para uma complicação clínica penetrante e persistente que afeta pessoas com mobilidade restrita. A permanência em posição deitada ou sentada por muito tempo são normalmente os fatores causais.

A úlcera de decúbito é uma lesão isquêmica causada pela compressão do entrelaçamento arterial dos tecidos comprimidos entre dois planos duros, podendo estes ser uma superfície óssea e o plano do leito. Podem se desenvolver em qualquer parte do corpo que esteja irritada de modo persistente, criando condições para destruição da epiderme. Podendo ela variar de uma área de eritema até uma ulceração profunda que expõe o osso

São causadas por uma combinação de dois fatores, os intrínsecos e os extrínsecos. Dentre os intrínsecos o mais importante é a perda da sensibilidade dolorosa que faz com que o paciente mude de posição quando a pressão sobre um ponto torna-se excessiva, já os extrínsecos o mais relevante é a pressão local que não deve ultrapassar 30 mmHg.

A evolução desta úlcera se dá pela infecção bacteriana. Os tecidos necrosados se infectam obrigatoriamente por estarem num meio propício ao crescimento e sob condições favoráveis de cultivo. As bactérias crescem e se multiplicam a cada meia hora o que permite a destruição do tecido infectado rapidamente

Entre os tratamentos utilizados nas úlceras de decúbitos está em lugar destacado a laser terapia que pode auxiliar na resolução do processo inflamatório estimulando a libe-

ração de substâncias pré-formadas como a histamina, serotonina e inibindo a formação de bradicinina atuando similarmente as drogas antiinflamatórias.

Ao mesmo tempo atua na cicatrização através da reepitelização a partir de restos basais, melhora a trófica tissular a partir do estímulo da produção de ATP. Secundariamente proporciona estímulo da microcirculação através de mediadores químicos.

A laserterapia seria o recurso de primeira opção vista os benefícios acima enumerados se não contasse com a contra-indicação absoluta de não poder ser realizada em processos bacterianos sem cobertura previa de terapia antibiótica. Entretanto não é raro o fisioterapeuta receber em sua clínica pacientes que poderiam ser tratados com o laser porem os mesmos não fazem ou não podem fazer uso da antibioterapia.

Esta questão motivou o estudo mais aprofundado do crescimento bacteriano em úlceras após a aplicação do laser.

Metodologia

Para dar cumprimento ao trabalho foram selecionados paciente do Centro de Reabilitação Física Dom Bosco mantido pelas faculdades Salesianas de Lins.

Para ser selecionado o paciente teve que preencher o seguinte critério: ter úlcera de decúbito nível 4 em escala de 1 à 5, devendo a mesma estar infectada após comprovação por cultura microbiológica e não estar fazendo uso de droga antibiótica.

Após a seleção de pacientes que cumpriam os requisitos foram coletadas amostras provenientes de úlceras de decúbitos infectadas, com swab. Este material clínico foi semeado em tubos de ensaio contendo meio de cultura liquido - TSB - e em placas de Petri com meio ágar enriquecido - TSA.

As sementeiras foram realizadas em quatro amostras, duas liquidas e duas sólidas para se fazer um estudo comparativo.

Aleatoriamente foi pego um dos tubos que foi submetido a dois picos de radiação laser, sendo a forma de aplicação por pontos, enquanto que em uma das placas foi aplicado laser na forma de varredura estas amostras foram denominadas respectivamente I a e I b.

Todas as amostras foram incubadas em estufa bacteriológica em temperatura de 37°C por vinte e quatro horas.

Após este período, foi realizada a contagem de bactérias em placas pelo método de diluição. O grupo controle também foi submetido a contagem. Este processo foi realizado por dez dias consecutivos, isto é irradiação, incubação e contagem das unidades formadoras de colônias -UFC.

Foram efetuadas duas coletas distintas de material clínico para estudo no decorrer da pesquisa, sendo que, estas duas amostras passaram pelo mesmo processo descrito acima. Assim foram divididas: amostras I e amostras II.

Paralelamente eram realizados esfregaços das colônias crescidas em ágar e coloridas pelo método de Gram, para identificação morfotintorial.

Equipamento laser

Foi utilizado um aparelho emissor de laser HeNe da marca KLD Biosistemas, modelo PLASMAX LHN 879, com os seguintes parâmetros: Saída de 3mW, comprimento de onda 632,8 nm, feixe de luz único de cor vermelho, emissão continua e direta.

Contagem microbiológica

Foi utilizado o método de diluição *Pour Plates* onde foi pipetado 0,1 ml da cultura de cada recipiente de meio liquido e colocado em um tubo com 0,9 ml de solução de cloreto de sódio, realizando assim a diluição em 1:10. Em seguida, foi pipetados 0,1 ml da diluição 1:10 em um tubo com 0,9 ml de cloreto de sódio realizando diluição 1:100. Continuo-se diluindo até alcançar a diluição 1:1010, método *Pour Plates*. Semeou-se 0,1 de cada recipiente de diferentes diluição em placas de Petri; em seguida, adicionou-se o meio de cultura liquefeito e resfriado a uma temperatura aproximada de 45° C.

Do conjunto de placas incubadas, foram escolhidas as melhores dentro de uma diluição, sendo que as melhores foram entre 1:105 à 1:1010. Foi realizada a contagem de cada placa, com e sem radiação laser, tirou-se a média da colônia e multiplicou-se pelo fator de diluição.

As placas de Petri foram observadas macroscopicamente, para avaliação do cresci-

mento bacteriano e as colônias foram transferidas para meio de cultura liquido, incubadas e contadas. Este procedimento foi realizado diariamente durante o decorrer da pesquisa.

Grupo controle

As amostras bacterianas foram divididas em dois grupos: grupo 1, amostras com radiação laser, grupo 2, amostras sem radiação laser. O grupo sem radiação laser serviu de controle comparativo da evolução bacteriana. O grupo controle de amostras sem radiação laser foi submetido, diariamente, aos mesmos procedimentos microbiológicos que os realizados no grupo laser.

Resultados

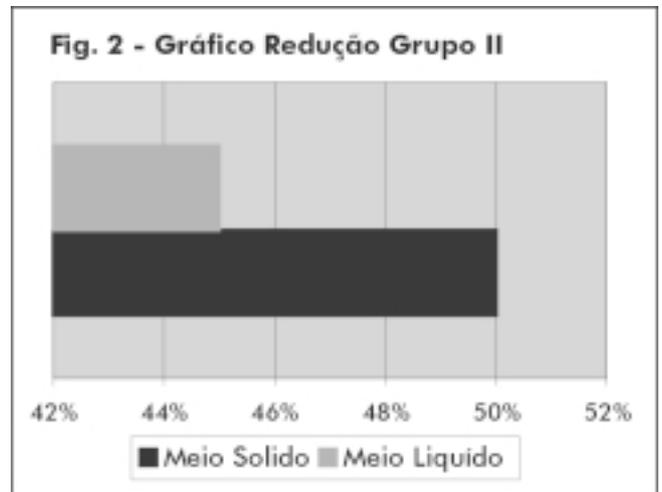
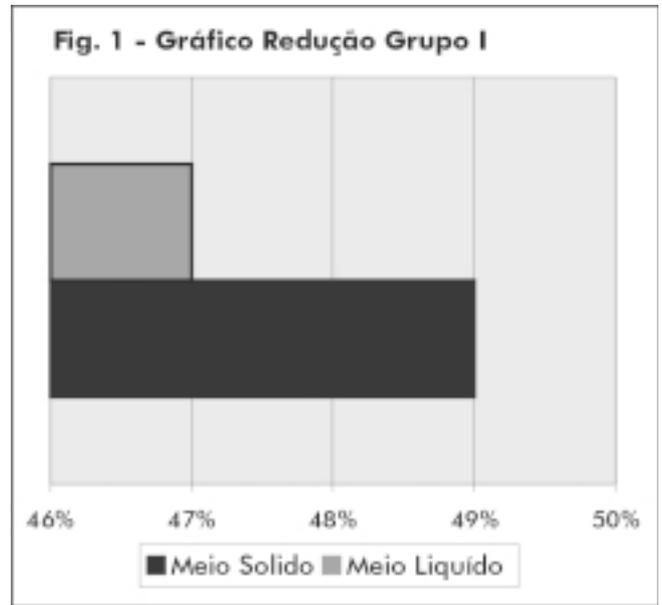
Constatou-se, após os exames microbiológicos *in vitro* (tabela 1) que as amostras submetidas à radiação laser apresentava crescimento bacteriano menor que o grupo controle:

Amostra grupo I

Meio sólido com radiação laser 3.446 UFC; meio sólido grupo controle 5.134 UFC; meio liquido com radiação laser 3.485 UFC; meio liquido grupo controle 5.125 UFC. Perfazendo no meio sólido 49% de redução e no meio liquido 47% de redução do crescimento bacteriano (Fig.1).

Amostra grupo II

Meio sólido com radiação laser 3.997 UFC; meio sólido grupo controle 5.993 UFC; meio liquido com radiação laser 4.193 UFC; meio liquido controle 6.081 UFC. Perfazendo no meio sólido uma redução de 50% no crescimento bacteriano e no meio liquido 45% de redução do crescimento bacteriano (Fig. 2).

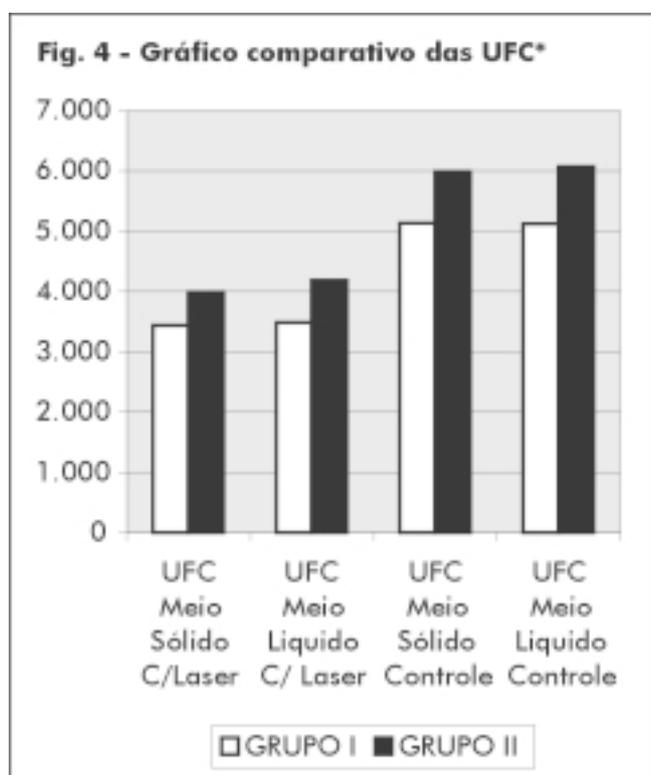
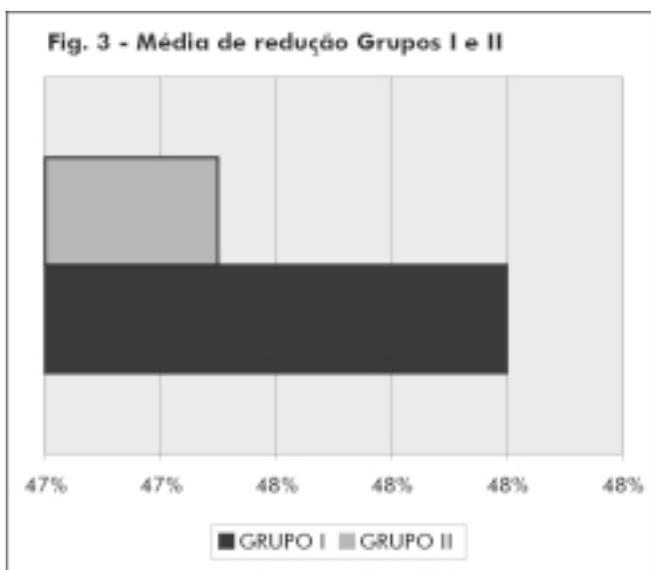


Os dados apresentados neste estudo apontam para resultado satisfatório da terapia laser em úlceras de decúbito mesmo estas não estando sob cobertura antibiótica, divergindo dos resultados descritos na literatura de referencia.

Tabela 1 -Dados descritivos da pesquisa

Amostra	UFC Meio Sólido C/Laser	UFC Meio Líquido C/ Laser	UFC Meio Sólido Controle	UFC Meio Líquido Controle	Média Redução
GRUPO I	3.446*	3.485*	5.134*	5.125*	48%
GRUPO II	3.997*	4.193*	5.993*	6.081*	47,5%

Unidades Formadoras de Colônias 10⁷



Entretanto deve-se ressaltar que o estudo realizado *in vitro* pode apresentar resultados diferentes dos estudos *in vivo* pois neste último existe uma série de fatores a serem considerados tais como: resposta imunológica do hospedeiro, barreiras, entre outras. Também se percebeu que alterações na dosimetria e tempo de exposição alteram o resultado levando a um crescimento acentuado das colônias

de bactérias principalmente logo após o término dos 10 dias propostos para a aplicação do laser

Na análise dos dados percebe-se uma diferença entre os resultados entre os meios sólido e líquido. Diferenças essas podem estar relacionadas com a absorção da energia laser por materiais muito brilhantes como o meio líquido, isto devido a reflexão da luz

Quanto a bacterioscopia realizada foi detectado predomínio de *Staphylococcus* e bacilos Gram negativos.

Discussão e Conclusões

Após os exames microbiológicos *in vitro* conclui-se que as amostras submetidas à radiação laser apresentaram crescimento bacteriano menor que o grupo controle. Isto foi observado diariamente tanto na avaliação macroscópica quanto na contagem de bactérias por método de diluição.

Ao final dos estudos constatou-se redução média de aproximadamente 48% do crescimento bacteriano das culturas submetidas à radiação laser em relação ao grupo controle que mostrou crescimento e números de bactérias mais abundantes.

Referências

1. Baxter GD, Bell A J, Allen JM et al. Low level laser therapy. Current clinical practice in Northern Ireland. *Physiotherapy* 1991;77:171-178.
2. Dyson M, Young S. The effect of laser therapy on wound contraction. *International Congress Laser Medicine Surgery* 1985: 215-219.
3. Dyson M, Young S. The effect of laser therapy on wound contraction and cellularity in mice. *Lasers in Medical Science* 1986;1:125-130.
4. Enwemeka CS. Laser biostimulation of healing wounds: Specific effects and mechanisms of action. *Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy*. 1988;9(10):333-338.
5. Enwemeka CS, Rodriguez O, Gall NG et al. Correlative ultrastructural and

- biomechanical changes induced in regenerating tendons exposed to laser photostimulation. *Lasers in Surgery and Medicine* 1990;(Suppl 2):12.
6. Fangde H, Pingan O, Haiyun K Irradiation effect of low power laser on the healing of experimental animal wounds. *Laser Journal* 1980;7:53.
 7. Glassberg E, Lask GP, Uitto J. Biological effects of low-energy laser irradiation. *Lasers in Surgery and Medicine* 1988;8:126.
 8. Hickman RA, Dyson M. The effect of laser therapy on angiogenesis during dermal repair. *Lasers in Surgery and Medicine* 1988;8:186.
 9. Kana JS, Hutschenreiter G, Haina D et al. Effect of low power density laser radiation on healing of open skin wounds in rats. *Archives of Surgery* 1981;116:293-296.
 10. King PR Low level laser therapy: a review. *Lasers in Medical Science* 1989;4:141-150.
 11. Kitchen S, Partridge CJ. A review of low level laser therapy. *Physiotherapy* 1991;77:161-168.
 12. Lam T, Abergel P, Meeker C et al. Low-energy lasers selectively enhance collagen synthesis. *Lasers in the Life Sciences* 1986;1:61-77.
 13. Lyons RF, Abergel RP, White RA et al. Biostimulation of wound healing in vivo by a helium neon laser. *Annals of Plastic Surgery* 1987;18:47-50.
 14. Mester AF, Mester A. Wound healing. *Laser Therapy* 1989;1:7-15.
 15. Robinson B, Walters J. The use of low level laser therapy in diabetic and other ulceration 1991.
 16. Rochkind S, Rousso M, Nissan M et al. Systemic effects of low power laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds and burns. *Lasers in Surgery and Medicine* 1989;9:174-182.
 17. Sugrue ME, Carolan J, Leen EJ et al. The use of infra-red laser therapy in the treatment of venous ulceration 1990.
 18. Sternick M. Atlas Schering de erupções ulcerosas. São Paulo 1977 Schering.
-