

COMPARAÇÃO MICROBIOLÓGICA ENTRE MEMBRANAS AMNIÓTICAS HUMANAS COLETADAS EM PARTOS VAGINAIS E CESARIANAS – PROJETO PILOTO*

MICROBIOLOGICAL COMPARISON BETWEEN HUMAN AMNIOTIC MEMBRANES OBTAINED FROM VAGINAL AND CESAREAN DELIVERIES – PILOT STUDY

Mauro Fernando S. de Deos¹, Vanessa de F. Volkmer², Marcio F. Chedid², Marcelo A. Fauri²,
Débora C. da Silva², Luis Carlos V. Severo Jr.³, Ricardo K. dos Santos², Viviane Malatur⁴,
Rita Beatriz Andrade⁴, Rinaldo de A. Pinto⁵

RESUMO

Objetivo: A membrana amniótica, uma membrana fina, pode ser utilizada como cobertura temporária em queimaduras profundas. O objetivo deste estudo é o de verificar as possíveis diferenças quanto à contaminação bacteriana entre as membranas de partos cesáreo e vaginal, assim como avaliar a viabilidade ou não do uso clínico-cirúrgico da membrana armazenada.

Métodos: Foram coletadas 12 membranas amnióticas de mulheres submetidas a parto cesáreo e vaginal no Centro Obstétrico do HCPA. Cada membrana amniótica foi armazenada em cinco frascos diferentes contendo soro fisiológico, dos quais foram obtidas amostras para análise no momento da coleta e nos dias 7, 14, 21 e 28. Essas amostras foram testadas quanto à contaminação bacteriana, analisando sua relação com o tempo de armazenamento e com o tipo de parto realizado. O estudo é um piloto e tem um delineamento transversal.

Resultados: A comparação entre os tipos de parto mostrou um risco relativo (RR) de 2,67 de contaminação no parto vaginal em relação à cesariana (IC de 95%: 1,09 a 6,52), $P = 0,08$. Não foi verificada contaminação em nenhum dos frascos no momento da coleta.

Conclusão: Todas as membranas coletadas de parto vaginal apresentaram crescimento bacteriano no processo de estocagem, levando à sua inviabilidade teórica para uso em Bancos de Membrana Amniótica.

Unitermos: Membrana amniótica; queimaduras; cobertura temporária.

Objective: The amniotic membrane, a thin membrane, may be used as a temporary cover on deep burns. The objective of this study is to identify the differences regarding bacterial contamination between membranes of vaginal and cesarean deliveries, as well as to assess the possibility of the clinical use of stored membranes.

Methods: Twelve membranes were obtained from women submitted to vaginal and cesarean deliveries at the Obstetric Center of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Each amniotic membrane was stored in five different flasks containing a physiological solution. Samples were obtained from these flasks for analysis on days 1, 7, 14, 21 and 28. These samples were tested for bacterial contamination, analyzing its relation to time of storage and type of delivery. This is a pilot study with a transversal design.

Results: The comparison between types of delivery yielded a relative risk of contamination in vaginal delivery (RR) of 2.67 (95% CI: 1.09-6.52) and no significance ($P = 0.08$). No contamination was found on day 1 flasks.

Conclusion: All membranes derived from vaginal deliveries ended up showing bacterial contamination during the storage period, which lead to a theoretical unavailability for its use on Amniotic Membrane Banks.

Key-words: Amniotic membrane; burns; temporary cover.

* Trabalho realizado no Serviço de Cirurgia Plástica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

¹ Cirurgião Plástico. Mestre em Cirurgia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Presidente da Regional Sul da Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica.

² Acadêmico(a) da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Correspondência: Marcelo A. Fauri, Rua Mariland 1367/902, CEP 90440-191, Porto Alegre, RS, Brasil. Fone/Fax: +55-51-3332.0339; e-mail: mfauri@via-rs.net

³ Médico.

⁴ Microbiologista do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

INTRODUÇÃO

As queimaduras térmicas e elétricas representam um problema de grandes dimensões sociais e econômicas. Cerca de dois milhões de lesões dessa natureza ocorrem por ano nos Estados Unidos da América (EUA), sendo causa direta de cerca de 10.000 óbitos. Seu manejo, além do período de tratamento intra-hospitalar, envolve reconstruções, reabilitação e readaptação intensivas após a alta hospitalar. Uma queimadura severa é um dos eventos traumáticos mais importantes ao qual pode-se ser submetido com possibilidade de sobrevivência, pois apresenta uma taxa de morbidade extremamente elevada (1,2).

O fechamento das queimaduras profundas é o passo mais importante para a recuperação do paciente queimado (3). Em seu manejo, há quatro problemas principais, dois a curto prazo (invasão bacteriana maciça e desidratação) e dois a médio e longo prazos (perda da função e da qualidade estética) (3). Um grande obstáculo à cicatrização da queimadura é a invasão bacteriana. Por isso, deve-se limpar a ferida, controlando o ambiente, retirando todo o tecido necrótico e usando um bactericida adequado. Agentes tópicos (sulfadiazina de prata, mafenida, clorhexidina, iodo povidine, nitrofurazona) retardam a colonização local, mas não esterilizam a ferida e também não corrigem o defeito de defesa da barreira cutânea (4).

Não há um consenso sobre métodos de obtenção, tratamento e estocagem de membrana amniótica. Para iniciar a utilização dessas membranas como cobertura temporária de queimaduras, deve-se ter idéia dos métodos de obtenção, do tempo de estocagem e da manutenção do material em condições assépticas.

Existem estudos que utilizam somente parto cesáreo para obtenção da membrana amniótica, enquanto outros se restringem a material de partos vaginais. Não há distinção clara, na literatura, sobre os critérios utilizados na escolha entre as duas situações. Existe uma preferência de alguns autores pelo uso de membranas amnióticas coletadas por parto cesáreo (5,6), sem uma justificativa científica para tal. Levando-se em consideração a maior disponibilidade de membranas obtidas de partos vaginais e a considerável incidência de pacientes grandes queimados, faz-se imperativo que se verifiquem as possíveis diferenças quanto à contaminação bacteriana entre as membranas obtidas de partos cesáreo e vaginal. Essa verificação deve ser realizada no momento da coleta e durante o período de armazenamento. A conseqüente viabilidade ou não do uso clínico-cirúrgico da membrana armazenada também deve ser avaliada.

Possivelmente, o parto cesáreo forneça uma membrana mais limpa, mas não há estudos comparando os dois tipos de parto. Há autores que não fizeram distinção entre os tipos de parto (7,8).

Este estudo tem por objetivo comparar as membranas amnióticas obtidas em parto vaginal e em cesarianas quanto

ao crescimento bacteriano no momento da coleta e durante o tempo de armazenamento. Secundariamente, propõe-se também a avaliar possíveis agentes contaminadores durante o processo de coleta e armazenamento da membrana amniótica.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 12 membranas amnióticas de mulheres submetidas a parto vaginal e a cesariana no Centro Obstétrico do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CO-HCPA). Enquanto aguardavam a fase ativa do trabalho de parto, essas mulheres foram incluídas no estudo a partir de um questionário protocolar e, posteriormente, assinaram o termo de consentimento informado. Ambos os documentos foram elaborados seguindo orientações da Comissão de Pesquisa e Ética vinculada ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Cumprida essa etapa, o mesmo pesquisador que aplicou o questionário procedeu à dissecação da placenta.

Completada a dequitação da placenta, em ambiente asséptico, foi realizada a separação da membrana amniótica do córion. O pesquisador responsável pela coleta identificou a membrana amniótica por um código, de maneira que o microbiologista que realizou a análise de crescimento bacteriano não teve conhecimento da identidade do coletor e nem do tipo de parto realizado na paciente relativa àquela placenta.

PROCEDIMENTO BACTERIOLÓGICO

Cerca de 1 g da membrana amniótica foi enviada à Unidade de Microbiologia do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre em recipiente estéril.

Os fragmentos de membrana amniótica foram armazenados em cinco frascos diferentes por no máximo 4 semanas, sendo obtidas amostras para cultura e análise no momento da coleta (frasco 1) e nos dias 7 (frasco 2), 14 (frasco 3), 21 (frasco 4) e 28 (frasco 5) de armazenamento. Essas amostras foram testadas quanto à contaminação bacteriana, analisando sua relação com o tempo de armazenamento. Foi utilizado como critério de contaminação da amostra um crescimento bacteriano de mais de 10^5 unidades formadoras de colônia por grama de tecido (4).

Posteriormente, analisou-se a relação entre tipo de parto, tempo de armazenamento e crescimento bacteriano.

As bactérias de interesse foram identificadas utilizando-se provas bioquímicas convencionais. Os microorganismos pesquisados foram os seguintes: *Streptococcus agalactie* (grupo B), *Streptococcus viridans*, enterococos, estafilococos, *Listeria sp*, bacilos gram-negativos enterais e não-fermentados, tais como *Pseudomonas aeruginosa*.

DELINEAMENTO DO TRABALHO

O estudo tem um delineamento transversal. O presente estudo é o piloto com 12 membranas coletadas de partos vaginais e de partos cesáreos durante um mês de trabalho. Será calculado, a partir deste piloto, o tamanho final da amostra necessária para detecção de diferença significativa entre as variáveis em estudo, uma vez que não existem, na literatura, dados referentes a essa comparação.

A associação entre contaminação ou não da membrana e sua origem (parto vaginal ou cesáreo) foi analisada através do teste de qui-quadrado. O cálculo do risco relativo foi efetuado considerando intervalo de confiança de 95%. O nível de significância adotado foi de 5% ($\alpha = 0,05$).

RESULTADOS

Foram coletadas 12 membranas amnióticas em novembro de 2000, selecionadas de acordo com os critérios de inclusão do trabalho e seguindo a demanda normal da Emergência Obstétrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

A idade média das pacientes foi de 22,8 anos (DP = 6,16). Todas as pacientes apresentavam idade gestacional acima de 37 e abaixo de 42 semanas. Nenhuma tinha diagnóstico prévio de infecção pré-natal e todas foram testadas na chegada à Emergência Obstétrica para pesquisa de hepatite A, B e C, sífilis, HIV e toxoplasmose. Todas as pacientes apresentaram sorologia negativa na totalidade dos testes. Nenhuma apresentava tempo de ruptura de bolsa amniótica acima de 4 horas ou infecção intra-uterina durante a gestação. Também foram excluídas as pacientes com líquido amniótico tinto de mecônio ou com Perfil Biofísico Fetal com valor menor ou igual a 7.

Das 12 placentas coletadas, oito foram originárias de parto vaginal (66,7%) e quatro de parto cesáreo (33,3%). Das oito membranas coletadas nos partos vaginais, cinco apresentaram algum grau de contaminação, totalizando 62,5% das membranas coletadas por via vaginal e 41,7% do total de membranas amnióticas coletadas.

Não houve correlação significativa entre a idade das pacientes e a presença de contaminação das amostras ($P = 0,8$). A comparação entre o tipo de parto e a presença ou não de contaminação mostrou um risco relativo (RR) de 2,67 (IC de 95%: 1,09 a 6,52), sendo encontrado um $P = 0,08$.

Durante a análise dos frascos, não foi verificada contaminação no momento da coleta em nenhuma das membranas coletadas. Não houve homogeneidade com

relação à presença e ao tipo de crescimento bacteriano nos diferentes momentos.

Os achados mais comuns no crescimento bacteriano estão demonstrados na tabela 1.

Tabela 1. Membranas que apresentam crescimento bacteriano

	Frasco 1	Frasco 2	Frasco 3	Frasco 4	Frasco 5
MA 15	ACB	ACB	Enterococo	ACB	Enterococo
MA 18	ACB	ACB	ACB	Enterococo	ACB
MA 20	ACB	Enterococo	Enterococo	Enterococo	BGP corineforme
MA 28	ACB	Enterococo Streptococcus viridans Streptococcus b hemolítico	Streptococcus viridans Enterococo	Enterococo	Enterococo Streptococcus viridans
MA 29	ACB	Enterococo	Streptococcus viridans	Streptococcus viridans E. coli	Enterococo

ACB- Ausência de crescimento bacteriano
BGP- Bacilo gram-positivo

DISCUSSÃO

O uso de membranas amnióticas como cobertura biológica temporária de queimaduras profundas é mais disseminado em países em desenvolvimento (9).

Entretanto, embora várias questões de cunho prático, como a viabilidade técnica e econômica de seu uso, já tenham sido respondidas, ainda há um grande hiato quanto a detalhes metodológicos da coleta e do armazenamento. Assim, há contradições: alguns estudos utilizam somente o parto cesáreo para obtenção da membrana amniótica, enquanto outros utilizam somente material de partos vaginais, sem que haja descrição, na literatura, dos critérios utilizados na escolha entre as duas técnicas (7,8).

Os valores parciais obtidos confirmam a tendência dos pesquisadores de usar somente partos cesáreos para diminuir a contaminação das membranas amnióticas coletadas.

Não se pode ser conclusivo sobre esses dados pois a amostra usada é muito pequena para que os valores encontrados tenham significância estatística. A partir do aumento da amostra e do conseqüente estreitamento do intervalo de confiança, os resultados obtidos poderão ser validados.

Por tratar-se de um projeto piloto, lidou-se com dados sem projeção estatística, mas atingindo o objetivo de domínio na técnica de coleta, armazenamento, avaliação microbiológica e definição de critérios de contaminação. Uma vez que a prevalência de contaminação das amostras

foi alta (41,7% do total de membranas), projeta-se um tamanho de amostra mínimo para demonstrar uma correlação significativa entre as variáveis relevantes em estudo (tipo de parto versus contaminação da amostra) considerando uma porcentagem máxima arbitrária de contaminação de 38%, totalizando 85 membranas.

Mesmo estando limpas no momento da coleta e armazenamento, verificou-se que algumas membranas amnióticas coletadas de parto vaginal sofrem crescimento bacteriano no processo de estocagem. Por isso, seria inviável a sua aplicação direta na cobertura de queimaduras. Porém, apesar de aumentados os custos, antes de aplicar a membrana na queimadura, esta poderia ser submetida a processo de limpeza, esterilização ou preservação (10,11).

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer a todos os membros do Centro Obstétrico do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial ao Dr. Eduardo Coelho Dias, ao Dr. Valentino Antônio Magno e ao Professor Dr. Alberto Mantovani Abeche.

REFERÊNCIAS

1. Demling RH, Way LW. Burns and Other Thermal Injuries. In: Way LW, editor. *Current - Surgical Diagnosis and Treatment*. 10th ed. London: Appleton and Lange; 1994. Pp. 241-256.
2. Press B. Thermal and Electrical Injuries. In: Smith JW, Aston SJ, editors. *Grabb and Smith's Plastic Surgery*. 4th ed. Boston: Little, Brown and Company; 1991. Pp. 675-730.
3. Sharma SC, Bagree MM, Bhat AL, Banga BB, Singh MP. Amniotic membrane is an effective burn dressing material. *Jpn J Surg* 1985;15(2):140-3.
4. Herruzo-Cabrera R, Garcia-Torres V, Rey-Calero J, Vizcaina-Alcaide. Evaluation of penetration strength, bactericidal efficacy and spectrum of action of several antimicrobial creams against isolated microorganisms in a burn centre. *Burns* 1992;18(1):39-44.
5. Ganatra MA, Durrani KM. Methods of obtaining and preparation of fresh human amniotic membrane for clinical use. *J Pak Med Assoc* 1996;46(6):126-8.
6. Sawhney CP. Amniotic membrane as a biological dressing in the management of burns. *Burns* 1984;15(5):339-42.
7. Subrahmanyam M. Amniotic membrane as a cover for micro skin grafts. *Br J Plast Surg* 1995;48:477-8.
8. Subrahmanyam M. Honey – impregnated gauze versus amniotic membrane in the treatment of burns. *Burns* 1994;20(4):331-3.
9. Ramakrishnan KM, Jayaraman V. Management of partial-thickness burn wounds by amniotic membrane: a cost-effective treatment in developing countries. *Burns* 1997;23 Suppl 1:33-6.
10. Tyszkiewicz JT, Uhrynowska-Tyszkiewicz IA, Kaminski A, Dziedzic-Goclawska A. Amnion allografts prepared in the Central Tissue Bank in Warsaw. *Ann Transplant* 1999;4(3-4):85-90.
11. Maral T, Borman H, Arslan H, Demirhan B, Akinbingol G, Haberal M. Effectiveness of human amnion preserved long-term in glycerol as a temporary biological dressing. *Burns* 1999;25(7):625-35.